

# **Stimulussensitive Polymersysteme zur Biokonjugation an Proteinen am Beispiel der Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase**

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von  
Benjamin Horstmann, M.Sc.  
aus Bünde

Referent:	Prof. Dr. Markus Biesalski
Korreferent:	Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes
Tag der Einreichung:	31. August 2015
Tag der mündlichen Prüfung:	12. Oktober 2015

Darmstadt 2015

**D17**

---

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder auf Tagungen präsentiert:**

- I. Vortrag: SOFT CONTROL Doktorandenworkshop, Breuberg, Deutschland 27. – 28. Oktober 2011, BIOCONJUGATED SMART POLYMERS
- II. Posterpräsentation: ASPM 2013 Austrian-Slovenian Polymer Meeting, Bled, Slowenien 3.–5. April 2013, LIGHT-SWITCHABLE POLYMERS FOR APPLICATIONS TOWARDS PROTEINS
- III. Posterpräsentation: SOFT CONTROL Switching surface properties with stimuli responsive soft matter, Darmstadt, Deutschland 22.– 24. September 2013; PHOTOSWITCHABLE POLYMER SYSTEMS TO CONTROL THE ENZYME ACTIVITY AND FOR PROTEIN PURIFICATION

**In Kooperation wurde bisher die folgende Arbeit veröffentlicht:**

B. Horstmann, M. Korbus, T. Friedmann, C. Wolff, C. M. Thiele, F.-J. Meyer-Almes, „*Synthesis of azobenzenealkylmaleimide probes to photocontrol the enzyme activity of a bacterial histone deacetylase-like amidohydrolase*“, Bioorganic Chemistry, 2014, 57, 155 – 161.

---

---

*„Die Entdeckung, daß es so einfach nicht ist, wie man gedacht hat, ist als Gewinn anzusehen.“*

Carl Friedrich von Weizsäcker  
(1912–2007)

---

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Professor Meyer-Almes, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor an der Hochschule Darmstadt zu promovieren, für seine vielen Vorschläge und Ideen zu diversen Themen und seine Kooperationsbereitschaft.

Mein großer Dank gilt Professor Markus Biesalksi, der meine Begeisterung für Polymere und Ihr Verhalten gefördert hat. Die konstruktiven Gespräche mit Ihm waren stets sehr förderlich für den Fortschritt meiner Arbeit.

Spezieller Dank gilt Professor Stefan Hüttenhain, der mir sein Labor und seine Ausrüstung für viele Experimente zur Verfügung stellte.

Ich danke vor allem den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der AG Biochemie von Professor Meyer-Almes und Professor Fuchsbauer; ihr herzlicher und freundlicher Umgang verschönerten meine Zeit in Darmstadt.

Ganz liebevoll möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die an mich geglaubt und mich stets unterstützt hat.

Einen besonderen Dank geht an meine Freundin Kerstin Fahrland für ausdauernde Unterstützung während der gesamten Promotion.

---

---

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG – MOTIVATION</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND KENNTNISSE</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Stimulussensitive Polymere</b>	<b>2</b>
2.1.1	Temperaturschaltbare Polymer	2
2.1.2	Lichtschaltbare Polymere – Lichtschaltbare Gruppen – Azobenzen	4
<b>2.2</b>	<b>Polymerreaktionen</b>	<b>7</b>
2.2.1	Freie Radikalische Polymerisation	7
2.2.2	Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs-Polymerisation (RAFT-Polymerisation)	8
2.2.3	Polymeranaloge Umsetzungen	10
<b>2.3</b>	<b>Biokonjugation</b>	<b>12</b>
2.3.1	Proteinseitengruppen und reaktive Gruppen	12
2.3.2	Biokonjugationen mit synthetischen Polymeren	13
<b>2.4</b>	<b>Histon-Deacetylasen und Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase (HDAH)</b>	<b>15</b>
<b>2.5</b>	<b>Lichtschaltbare Proteine</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG UND STRATEGIE</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN UND GERÄTE</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>„Small Molecules“ zur Bindung an Proteine</b>	<b>25</b>
5.1.1	Azobenzalkylmaleimidderivate (AMDs)	25
5.1.2	Synthese der AMDs über die Aminoalkylmaleimide	26
<b>5.2</b>	<b>Smart Polymers zur Bindung an Proteine</b>	<b>29</b>
5.2.1	Copolymere mit NHS-Aktivestergruppen	29
5.2.2	Polypentafluorphenylacrylat und polymeranaloge Umsetzung	40
<b>5.3</b>	<b>Bestimmung des Isomerisierungsgrades</b>	<b>73</b>
5.3.1	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten und des photostationären Zustandes von AZEA	74
5.3.2	Extinktionskoeffizient und photostationärer Zustandes von polymergebundenen AZEA	79

---



<b>5.4</b>	<b>Temperaturschaltung der Polymere</b>	<b>84</b>
5.4.1	P[DMAA-AZAA-NAS]	84
5.4.2	P[DMAA-AZEA-NIPAAm]	85
5.4.3	P[DMAA-AZEA-AHMal]	88
5.4.4	P[DMAA-AZEA]	94
5.4.5	Polymere ohne Azobenzengruppen	98
<b>5.5</b>	<b>Umsetzung der Maleimidbausteine zur Darstellung von Proteinkonjugaten</b>	<b>102</b>
5.5.1	Anwendung der AMDs	102
5.5.2	Umsetzung der Maleimidpolymeren	106
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>115</b>
7.1	Vorstufen	115
7.2	Aminobausteine	124
7.3	Azobenzalkylmaleimide	127
7.4	Monomere	130
7.5	Polymersynthesen	132
7.5.1	DMAA-AZEA-NAS Copolymere	132
7.5.2	Polypentafluorphenylacrylat	133
7.5.3	Polymeranaloge Umsetzungen	134
7.5.4	Poly( <i>N</i> -Isopropylacrylamid)	140
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>141</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

abs.:	<i>absorbance</i> (engl.), Extinktion
APAH:	Acetylpolyamin-amidohydrolase
BCA:	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
CFRP:	<i>Controlled Free Radical Polymerization</i> (engl.), kontrollierte freie radikalische Polymerisation
COSY:	<i>Correlation spectroscopy</i> (engl.)
DC:	Dünnschichtchromatographie
DCC:	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM:	Dichlormethan
DIEA:	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMA:	Dimethylamin
DMAA:	Dimethylacrylamid
DMF:	Dimethylformamid
EDC:	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI:	Elektrosprayionisierung
Fmoc:	Fluorenylmethoxycarbonyl
GPC:	Gel-Permeations-Chromatographie
HAT:	Histon-Acetyl-Transferase
HDAC:	Histon-Deacetylase
HDAH:	Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase
HMPA:	<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)methacrylamid
HOBt:	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC:	Hochleistungsflüssigchromatographie
$K_m$	Michaelis-Konstante
LCST:	<i>Low critical solution temperature</i> (engl.), untere kritische Lösungstemperatur
MS:	Massenspektrometrie
MWCO:	Molecular Weight Cut Off
NMR:	Kernspinresonanzspektroskopie
NOESY:	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (engl.)
PDI:	Polydispersitätsindex
PDMAA:	Poly- <i>N,N</i> -dimethylacrylat
PIFA:	[Bis(trifluoracetoxy)iod]benzol
PNIPAAm:	Poly- <i>N</i> -isopropylacrylamid

---

---

PPFPA:	Polypentafluorphenylacrylat
PVP:	Poly(vinylpyrrolidin)
rt:	Raumtemperatur
SAHA:	Suberoylanilidehydroxamsäure
TEA:	Triethylamin
TFA:	Trifluoressigsäure
THF:	Tetrahydrofuran
TMS:	Tetramethylsilan
$v_{\max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit

---





Biokonjugierbare, schaltbare Polymere sind ein faszinierendes Feld in der Polymerforschung für biomedizinische Anwendungen. Mit diesen Systemen können Polymer-Protein-Hybride generiert werden (1–4). Hiermit lassen sich biologische Komponenten, nachfolgend somit auch biologische Abläufe, kontrollieren. Die besonderen Eigenschaften von Polymeren, bzw. stimulussensitiven Polymeren werden dabei ausgenutzt, um Einfluss auf das Biomolekül nehmen zu können.

Um die Makrostruktur eines schaltbaren Polymers zu ändern, benötigt man einen Stimulus. Temperatur ist das bekannteste und meist untersuchte Beispiel für einen solchen Stimulus. Bei temperaturschaltbaren Polymeren erfolgt oberhalb einer bestimmten Temperatur (LCST, *low critical solution temperature*; untere kritische Lösungstemperatur) ein Phasenübergang in dessen Folge das Polymer in der Lösung kollabiert. Die kritische Temperatur ist abhängig vom Polymer und kann durch Copolymerisation mit polaren oder unpolaren Monomeren variiert werden. Polyacrylamide, insbesondere Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm), sind für dieses Verhalten bekannt. PDMAA (Poly(*N,N*-dimethylacrylamid) ist ein wasserlösliches, unreaktives Polymer ohne eine LCST zwischen 5 und 100 °C. Durch Copolymerisation von DMMA (Dimethylacrylamid) mit einem hydrophoben Monomer kann ein temperaturschaltbares Polymer dargestellt werden.

Verwendet man ein photoschaltbares Monomer z.B. 4-Phenylazophenylacrylat kann die Polarität des Polymers durch Bestrahlung mit Licht verändert werden (5, 6). Dieses führt zu einem temperatur- und lichtschtbaren Polymer (7). Hier zeigt das Polymer, in Abhängigkeit der Konfiguration der Azobenzeneinheit, zwei verschiedene Temperaturen für den Phasenübergang. Dadurch sollte das temperaturschaltbare Polymer, innerhalb eines bestimmten Temperaturbereiches, durch Bestrahlung mit UV- oder Vis-Licht geschaltet werden können.

Kombiniert man diese Polymere mit biokonjugierbaren Gruppen, so ermöglichen diese diverse ersprießliche Protein-Polymer-Konjugate (8–11). Durch Lichtschaltung der Polymere und die damit verbundene Änderung der Polymermakrostruktur lässt sich ein starker Einfluss auf das Protein durch diesen bioorthogonalen Stimulus ausüben. Auf diese Art kann beispielsweise die Aktivität von Enzymen gesteuert werden.

Anwendung könnten solche Systeme bei enzymatischen Produktionen oder in biochemischen Assays finden, und zwar immer dann, wenn sich die Funktion eines Enzymes ändern soll, ohne dass die Bedingungen für die Zusammensetzung verändert werden. Lichtschaltbare, biokonjugierbare Polymere stellen eine Möglichkeit dar, die Funktion eines Proteins in einer wässrigen Lösung, unter milden Bedingungen und ohne den Zusatz von weiteren Hilfsstoffen, zu kontrollieren.

### 2.1 Stimulussensitive Polymere

Stimulussensitive Polymere, in der englischsprachigen Literatur häufig ‘*Smart Polymers*‘ genannt, stellen ein bedeutendes und wachsendes Feld in der Polymerwissenschaft dar (12). Ihre Besonderheit ist das außergewöhnliche, nichtlineare Verhalten beim Anlegen eines äußeren Reizes auf ihre Umgebung. Der Reiz ist auch die erste Möglichkeit, diese Gruppe zu klassieren. Diverse physikalische wie auch chemische oder enzymatische Stimuli kommen hierbei in Betracht. Die Änderung der Temperatur oder des pH-Wertes sind die häufigsten Varianten; weiterhin können auch andere Einflüsse wie Ionenstärke, Änderung des elektrischen oder magnetischen Feldes oder auch Bestrahlung mit Licht dieses Verhalten induzieren (13). Die Polymere kommen in verschiedenen Erscheinungsformen bzw. Architekturen vor: in Lösung, auf planaren oder sphärische Oberflächen, als Netzwerke oder auch in fester Form. Dementsprechend vielfältig ist ihr Verhalten auf einen Stimulus und sind somit auch ihre Anwendungsmöglichkeiten. Besonderes Interesse haben im letztem Jahrzehnt ‘*Smart Polymers*‘ für biotechnologische und biomedizinische Anwendung erfahren (1–4, 14–17). Hier ergeben sich diverse Möglichkeiten für maßgeschneiderte Polymersysteme, wie gezielte Wirkstofffreigabe, Zell- oder Proteinadhäsion und Steuerung von Protein-Polymerkonjugaten.

#### 2.1.1 Temperaturschaltbare Polymer

Die größte Klasse der stimulussensitiven Polymere stellen die temperatursensitiven Polymere dar. Umgeben von einem Solvens führt eine Temperaturänderung zu einer Konformationsänderung der Polymermoleküle. Betrachtet man Polymerlösungen, so zeigen temperaturschaltbare Systeme einen Übergang von einphasig zu zweiphasig in einem Konzentration-Temperatur-Phasendiagramm (siehe Abbildung 2-1). Diese Grenze wird kritische Lösungstemperatur genannt. Man kann hier zwischen einer unteren (LCST, low critical solution temperature) und einer oberen Grenztemperatur (UCST upper critical solution temperature) unterscheiden; es sind ebenfalls Systeme bekannt in denen beide existieren.

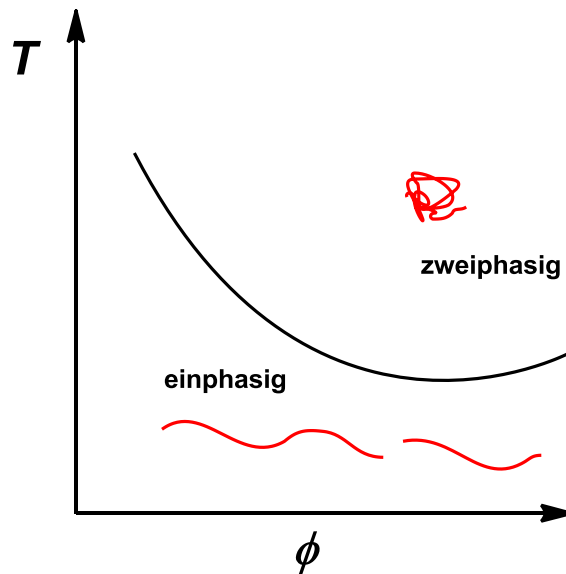


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung eines Phasendiagramms von einem Polymer mit einer unteren Löslichkeitstemperatur. Aufgetragen ist hier die Temperatur  $T$  gegen den Volumenanteil  $\phi$ . Der Phasenübergang (schwarze Linie) zeigt die LCST bei gegebenem Volumenanteil an. Unterhalb dieser Temperatur liegt das System einphasig, oberhalb zweiphasig vor.

Das bekannteste Beispiel für ein Polymer mit einer LCST ist Poly-*N*-Isopropylacrylamid (PNIPAAm) (18, 19). Seine Trübungstemperatur von 32 °C liegt sehr nahe an der Temperatur des menschlichen Körpers, deshalb ist es für viele Anwendungen, insbesondere biomedizinische, sehr interessant. PNIPAAm gehört zu den Polyacrylamiden. Viele Polymere dieser Klasse zeigen, abhängig von der Alkylseitengruppe, ein temperatursensitives Verhalten (20), siehe Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1: Verschiedene Polyalkylacrylamide und ihre Trübungstemperatur.

Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamid)	Poly( <i>N</i> - <i>n</i> -propylacrylamid)	Poly( <i>N</i> -cyclopropylacrylamid)	Poly( <i>N,N</i> -diethylacrylamid)	Poly( <i>N,N</i> -dimethylacrylamid)
<b>PNIPAAm</b>	<b>PNNPAM</b>	<b>PNCPPAM</b>	<b>PDEAM</b>	<b>PDMAA</b>
32°C (19)	10°C (21)	53°C (22)	33°C (23)	216°C (24)

Neben dieser Polymerklasse sind noch weitere Klassen beschrieben worden, die ein temperatursensitives Verhalten aufweisen. Unter anderem Polylactame, Polyvinylalkylamide und Polyalkyloxide, wie Polyethylenglycol bzw. Polyethylenoxid und Polypropylenoxid. Die Phasenübergangstemperatur ist von mehreren Faktoren abhängig. Wie aus dem Phasendiagramm schon hervorgeht, hat die Konzentration einen Einfluss. Außerdem sind die Salzkonzentration (25, 26), die Zusammensetzung des Lösemit-

---

tels (27) und die Molmasse der Polymere (28–30) von Bedeutung. Durch die Verwendung von polaren oder unpolaren Copolymerbausteinen kann zudem Einfluss auf die Trübungstemperatur genommen werden (31).

### 2.1.2 Lichtschaltbare Polymere – Lichtschaltbare Gruppen – Azobenzen

Wasserlösliche, temperaturschaltbare Polymersysteme sind meist die Basis für multistimulus-sensitive Polymere. Hierbei wird mit Hilfe eines weiteren Stimulus eine Änderung an der Seitenkettengruppe, und somit eine Änderung der ganzen Polymereigenschaften induziert. Lichtschaltbare Gruppen sind eine Möglichkeit, ein sensitives System in das Polymer einzufügen. Lichtschaltbare Moleküle lassen sich in zwei Kategorien einteilen: reversibel und nichtreversibel. Nichtreversibel schaltbare Gruppen „Caged Groups“, wie *ortho*-Nitrobenzyl (32), sind für Smart Polymers von geringer Bedeutung. Photochrome Substanzen sind hingegen das zentrale Element für lichtschaltbare Polymere. Der Begriff der Photochromie wurde Anfang der 1950er Jahre von Hirshberg geprägt. Er beschreibt die lichtinduzierte, reversible Isomerisierung eines Moleküls (33). Die verschiedenen Isomere unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften wie dem Absorptionsspektrum und der Polarität. Licht hat als Stimulus weitere Vorteile. Die Eintragung der Energie kann durch Variation der Lichtintensität, der Zeit und der Wellenlänge kontrolliert und spezifiziert werden. Weiterhin kann es räumlich aufgelöst eingetragen werden. Diese Kombination der Eigenschaften und Vorteile macht Photochrome für diverse Anwendungen sehr interessant (34–37).

Die verschiedenen Isomere der lichtschaltbaren Substanzen besitzen unterschiedliche Energieniveaus. Zur Überführung des stabileren Isomers in das lokale Energieminimum des Anderen muss energiereiches Licht in das System eingetragen werden. Beispiele für solche photochromen Moleküle sind in Abbildung 2-2 aufgeführt.

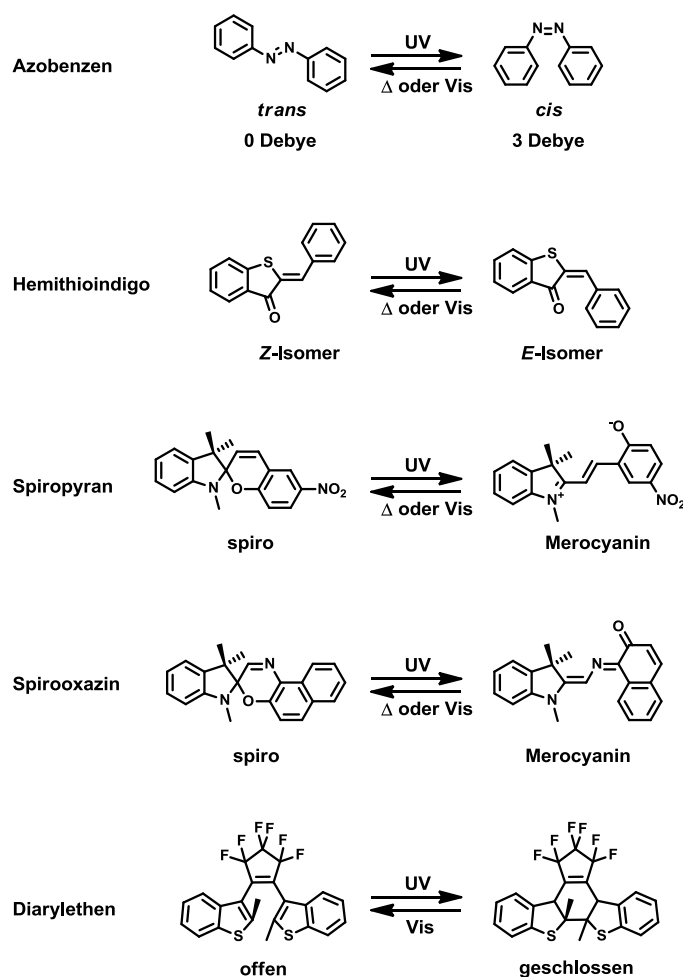


Abbildung 2-2: Diverse photochrome Moleküle in ihren Isomerformen.

Die am besten untersuchten Moleküle dieser Klasse sind Azobenzen und seine Derivate. Bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden von Hartley die zwei Isomere des Azobenzens beschrieben (6). Er bemerkte, dass die Absorptionseigenschaft und die Löslichkeit sich ändern, wenn eine Lösung mit Azobenzen dem Sonnenlicht ausgesetzt war, und dass dieser Prozess thermisch wieder umgekehrt werden konnte. Seitdem erschien eine Vielzahl von Publikationen zu diesem Thema, jedoch ist der Mechanismus nicht eindeutig geklärt (5). Vier mögliche Mechanismen sind bei der Umwandlung denkbar (siehe Abbildung 2-3). Bei Rotationsmechanismen wird um die Stickstoffbindung gedreht. Entweder erfolgt erst ein Bruch der  $\pi$ -Bindung und anschließend die Drehung um die N–N-Bindung wie beim Rotationsmechanismus oder der Winkel N=N–C wird etwas vergrößert und anschließend erfolgt die Drehung. Bei den Inversionsmechanismen erfolgt die Isomerisierung über Übergangszustände bei denen der Stickstoff, mit einem Bindungswinkel von  $0^\circ$  für die N=N–C Bindung,  $sp$  hybridisiert vorliegt. Hierbei kann unterschieden werden, ob der Mechanismus konzertiert erfolgt, also an beiden Stickstoffatomen zeitgleich, oder nur an einem Stickstoffatom.

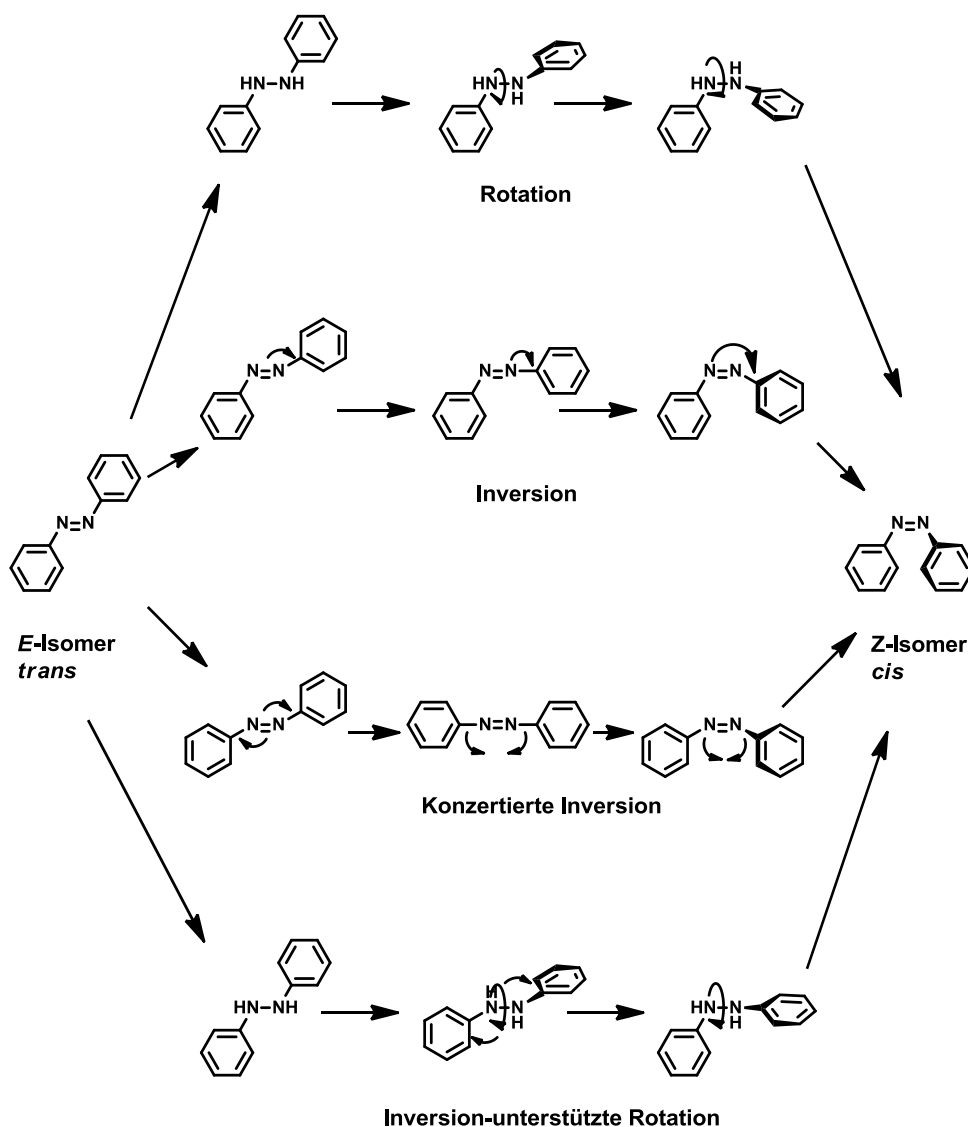


Abbildung 2-3: Angenommene Varianten der Isomerisierung des Azobenzens von *trans* nach *cis*. Abbildung modifiziert nach Bandara *et al.* (5).

Die beiden Isomere sind hinsichtlich ihrer Geometrie, Polarität und ihrer Absorptionsspektren verschieden. Während das *E*-Isomer nahezu planar ist, sind die Aromaten in der *cis*-Konfiguration verdreht. Der Diederwinkel der N=N-C=C Bindung beträgt abhängig von der Berechnungsmethode ca. 54 °, damit verkürzt sich das Molekül um ca. 3.5 Å (38). Bei der Überführung in das *Z*-Isomer wird die Symmetrie des *E*-Isomers aufgehoben. Dadurch ändert sich das Dipolmoment des Moleküls, es erhöht sich um ca. 3 Debye durch die gleiche Ausrichtung der freien Elektronenpaare der Azobrücke (siehe Abbildung 2-4).

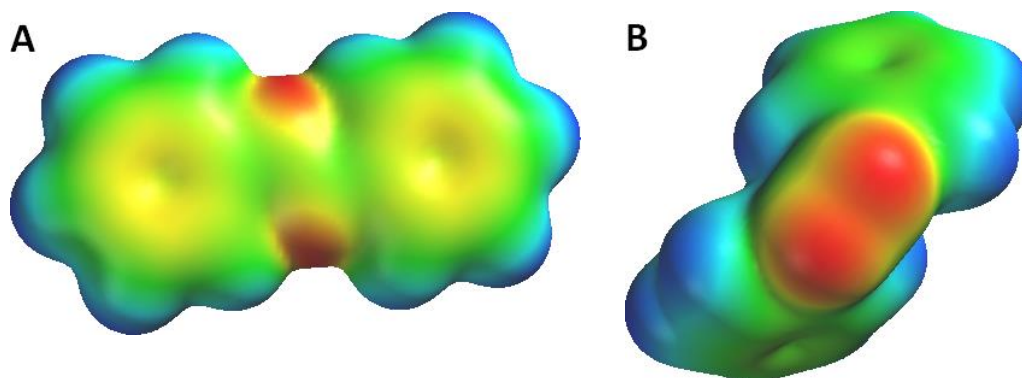


Abbildung 2-4: Kalottenmodell von Azobenzelen, A: *E*-Isomer, B: *Z*-Isomer. Elektrostatisches Potential berechnet mit DFT-B3LYP/6-31G\* durch das Chemoinformatikprogramm Spartan 04 der Firma WAVEFUNCTION.

Insbesondere die letzte Eigenschaft des Azobenzens ist für die Darstellung lichtschtbarer Polymere sehr interessant. Durch den Einbau dieser photochromen Gruppen in temperaturschaltbare Polymersysteme entstanden die ersten photosensitiven Polymere (39, 40) und später dualsensitive Polymere (41).

Kröger *et al.* (7) zeigten, dass durch Copolymerisation von Azobenzencrylat mit Dimethylacrylamid ein Trübungspunkt in PDMAA erzeugt werden konnte. Diese kritische Lösungstemperatur war abhängig vom Gehalt an Azobenzencrylat und von der Konfiguration des Photochromes.

## 2.2 Polymerreaktionen

### 2.2.1 Freie Radikalische Polymerisation

Polymere können mit verschiedenen Methoden hergestellt werden. Eine der gebräuchlichsten Polyreaktion zum Kettenwachstum ist die freie radikalische Polymerisation. Hierbei werden freie Radikale als Initiatoren benötigt, die mit den Monomerbausteinen eine Reaktion eingehen können. Als Monomere werden Alkene, wie Acrylsäurederivate, verwendet. Deren Doppelbindung kann von einem Radikal angegriffen werden und die Kettenreaktion initiieren. Vor der Polymerisation muss das Radikal gebildet werden. Die Initiatoren, meist Azoverbindungen oder Peroxide, bilden nach einer heterolytischen Spaltung Radikale, die anschließend mit dem ersten Monomer reagieren und die Polymerisation starten. Die Polymerisation kann in verschiedene Phasen unterteilt werden: Kettenstart, Kettenwachstum, Kettenabbruch (siehe Abbildung 2-5).



### Radikalbildung



$\text{In}_2$ : Initiator

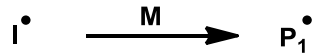
$\text{I}^\bullet$ : Initiatorfragment mit einem Radikal

$\text{M}$ : Monomer

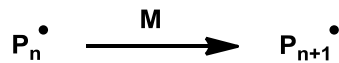
$\text{P}_1^\bullet$ : Polymerradikal mit der Kettenlänge 1

$\text{P}_n$ : Polymer mit der Kettenlänge n

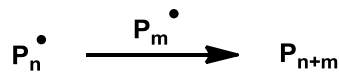
### Kettenstart:



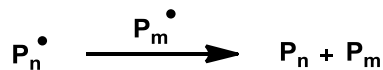
### Kettenwachstum:



### Kettenabbruch:



*Rekombination*



*Disproportionierung*

Abbildung 2-5: Reaktionsphasen der radikalischen Polymerisation nach der Radikalbildung durch den Initiatorzerfall.

Nach dem Kettenstart und der Übertragung des Radikals auf ein Monomer beginnt das Kettenwachstum: die Monomerbausteine reagieren mit dem Polymerradikal und verlängern es um eine Einheit. Für den Abbruch der Reaktion können zwei verschiedene Polymerradikale miteinander kombiniert werden (Rekombination) oder es kommt zur Übertragung eines Wasserstoffatoms zwischen zwei Polymerradikalen und zur Bildung einer  $\pi$ -Bindung durch die beiden bisher ungepaarten Elektronen (Disproportionierung).

## 2.2.2 Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs-Polymerisation (RAFT-Polymerisation)

Kontrollierte freie radikalische Polymerisationen (CFRP) haben seit einiger Zeit an Bedeutung gewonnen. Die Abwesenheit von Abbruchreaktionen, wie sie bei der freien radikalischen Polymerisation vorkommen, führt zu einer engeren Molmassenverteilung der entstehenden Polymere. Weitere Vorteile sind die Möglichkeit der Endgruppenfunktionalisierung, der Zugang zu komplexeren Polymerarchitekturen und die Kompatibilität mit verschiedenen Monomeren. Eine Variante der CFRP ist die RAFT-Polymerisation. Sie wurde 1998 zuerst von Rizzardo beschrieben (42) und gewinnt vermehrt an Bedeutung, auch hinsichtlich Anwendung in der Biochemie (43, 44). Für diese Polymerisationsart werden spezielle Verbindungen, RAFT-Agenzien, benötigt. Diese halten die Anzahl der reaktiven radi-

kalen Spezies konstant und kontrollieren somit das Kettenwachstum. Als RAFT-Reagenzien werden Thiocarbonylthioverbindungen wie Benzoldithiobenzoat verwendet (siehe Abbildung 2-6) (45). Wie auch bei der freien radikalischen Polymerisation wird zuerst ein Radikal benötigt, z.B. durch den Zerfall von Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN). Dieses reagiert anschließend mit einem Monomer, überträgt das Radikal und startet die Reaktion unter Ausbildung des ersten Polymerradikals ( $P_n^\bullet$ ). Dieses reagiert anschließend mit der Thiocarbonylthioverbindung und das gebildete radikalische Intermediat kann anschließend auf zwei Wegen zerfallen. Entweder kommt es zur Rückbildung des Transferagens und des Polymerradikals; oder es generiert eine neue, polymersubstituierte Thiocarbonylthioverbindung und ein Radikal. Letzteres kann wieder reinitiiert werden und mit einem Monomermolekül eine weitere Polymerkette starten. In der zweiten – der entscheidenden – Gleichgewichtsreaktion zur Ausbildung niedrig disperser Polymere, reagiert die polymersubstituierte Thiocarbonylthioverbindung mit einem Polymerradikal und erzeugt das radikalische RAFT-Dipolymer-Intermediat. Dieses kann wiederum auf zwei Wegen zerfallen und zwei verschiedene Polymerradikale ausgeben. Beide Polymerketten entstehen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit und können somit mit der gleichen Wahrscheinlichkeit mit weiteren Monomeren reagieren, dadurch entstehen Polymere mit einer geringeren Molmassenverteilung.

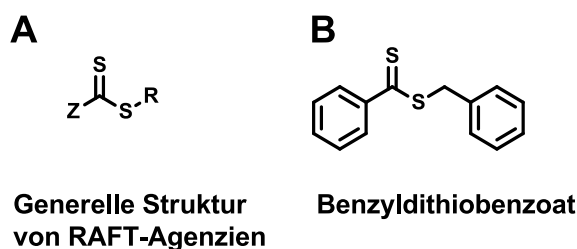
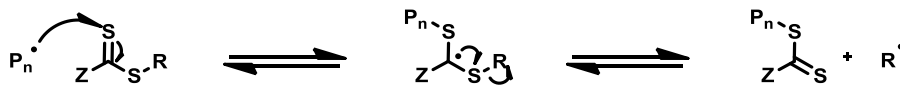
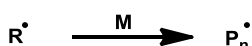


Abbildung 2-6: RAFT-Agenzien: A) Thiocarbonylthiostruktur mit den Seitengruppe R und Z; B) Benzoldithiobenzoat.

#### Erste Gleichgewichtsreaktion



#### Reinitiiierung



#### Zweite Gleichgewichtsreaktion

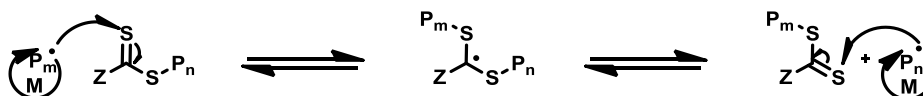


Abbildung 2-7: Mechanismus der RAFT-Polymerisation.

## 2.2.3 Polymeranaloge Umsetzungen

Polymeranaloge Umsetzungen sind Reaktionen am Polymer nach der Polymerisation unter Erhaltung des Polymerisationsgrades. Die Gründe für diese Modifizierungen sind vielfältig: zum Beispiel sind bei der Darstellung von Polymeren – abhängig von der Polymerisationsmethode und der verwendeten Monomere – bestimmte Bedingungen notwendig, die unter Umständen nicht kompatibel sind mit den gewünschten Funktionalitäten im finalen Polymer; oder die Monomerbausteine für das entsprechende Polymer sind nicht polymerisierbar; oder es müssen Modifikationen durchgeführt werden, die die Polymerstruktur wesentlich verändern. Bekannte Beispiele hierfür sind: die Synthese von Polyvinylalkohol (PVAL, hier wird zuerst der Polyester Polyvinylacetat (PVAC) produziert und anschließend hydrolysiert), die Vulkanisierung von Kautschuk oder die Festphasensynthese von Peptiden. Der Begriff der ‚*polymeranalogen Reaktion*‘ wurde von Hermann Staudinger eingeführt. Er beschrieb, dass funktionelle Gruppen am Polymer ebenso betrachtet und umgesetzt werden können, wie die von kleinen organischen Molekülen. Seitdem haben polymeranaloge Umsetzungen verstärkt Anwendung in der Synthese und Analyse von Makromolekülen gefunden. Abhängig von den funktionellen Gruppen im Polymer werden verschiedene Reagenzien und Moleküle benötigt, so dass die Umsetzungen anhand dieser klassiert werden können.

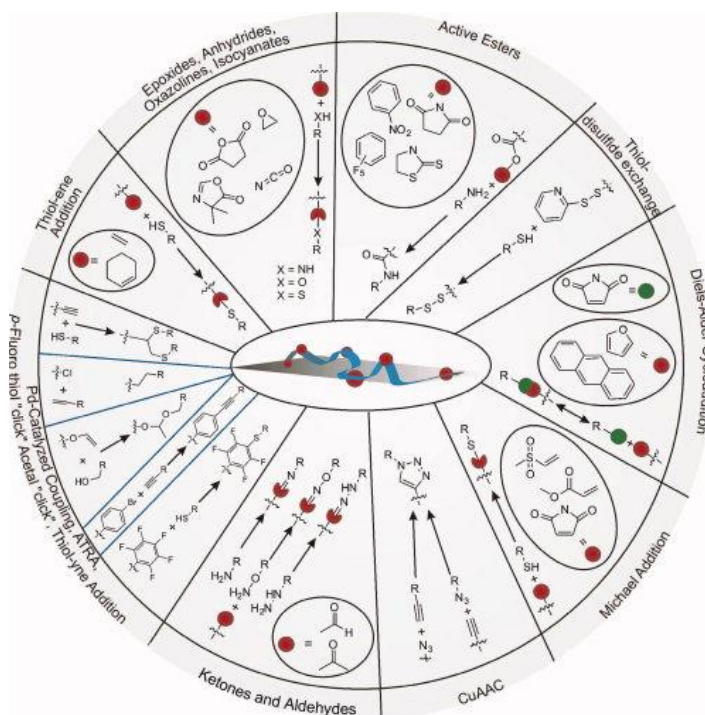


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung verschiedener Klassen zur Darstellung von funktionellen Polymeren durch polymeranaloge Umsetzung. Quelle: Günay, Theato und Klok 2013, *Standing on the Shoulders of Hermann Staudinger: Post-polymerization Modification from Past to Present* (46).

---

Eine der wichtigsten Klassen von funktionellen Gruppen am Polymer zur polymeranalogen Umsetzung ist die Klasse der Aktivester. Die hierbei verwendeten aktivierten Carboxylgruppen lassen sich unter milden Bedingungen mit einer Vielzahl von Aminokomponenten umsetzen; dieses macht sie insbesondere für die Festphasensynthese sehr interessant. Die Reaktivität der Aktivester ist von der Auswahl des Alkohols abhängig. Elektronenziehenden Gruppen des verwendeten Alkohols ermöglichen einen nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff. Häufig eingesetzte Alkohole sind Aromaten mit elektronenziehenden Gruppen wie Benzotriazole, *para*-Nitrophenol, Trichlorphenol oder Pentafluorphenol, aber auch *N*-Hydroxysuccinimid. Die Auswahl des Alkohols hängt wesentlich von der Anwendung ab. Die Triazolderivate wie 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol oder 1-Hydroxybenzotriazol sind sehr hydrolyseempfindlich und eignen sich somit weniger für polymeranaloge Umsetzung. Bei einer partiellen Hydrolyse würden unerwünschte Copolymere entstehen, die nicht mehr abgetrennt werden könnten. Sehr häufig finden NHS-Aktivester-Monomere wie *N*-Acryloxysuccinimid (NAS) oder *N*-Methacryloxysuccinimid Verwendung. Zuerst wurden diese Aktivesterpolymere von Ringsdorf *et al.* beschrieben (47). Aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit werden sie meist als Copolymere eingesetzt (48–50). Das Homopolymer ist in den meisten organischen Lösungsmitteln, mit Ausnahme von DMSO und DMF, nicht löslich, was es nur für wenige Anwendungen interessant macht (51). Ein weiterer Nachteil dieser Polymere ist die mögliche Ringöffnung des Succinimids und die Bildung von substituierten Glutarimidderivaten (52). Polypentafluorphenylacrylat (PPFPA) und Polypentafluorphenylmethacrylat sind Homoaktivesterpolymere, welche verstärkt für polymeranaloge Umsetzungen verwendet werden. Zuerst wurde Polypentafluorphenylacrylat 1999 von Blazejewski *et al.* (53) beschrieben, allerdings ohne die vielfältigen Möglichkeiten zu erkennen; diese wurden erst später aufgeführt (54). Nachfolgend wurden sie vielfach verwendet (55–58), da sie reaktiver und zugleich weniger hydrolyseempfindlich sind (46). Daneben finden andere Aktivesterpolymere wie Polythiazolidine-2-thione oder Poly-*para*-Nitrophenylacrylat nur wenig Verwendung.

---

## 2.3 Biokonjugation

Modifizierung von biologischen Molekülen ist eine bedeutende Methode, um ein größeres Verständnis oder weitere Anwendungen für Proteine, Lipide oder Antikörper zu bekommen. Die dadurch erhaltenen Konjugate können visualisiert und lokalisiert und für pharmatherapeutische oder analytische Methoden verwendet werden (59). Ebenso sind Wirkstofftransportvorgänge mit Protein-Pharmakon-Konjugaten möglich (60, 61). Daneben existieren weitere Anwendungen zur Charakterisierung des Proteins und von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

### 2.3.1 Proteinseitengruppen und reaktive Gruppen

Biokonjugationsreaktionen – hier Reaktionen an Proteinen – sind durch die funktionellen Seitengruppen und die das Biomolekül in seiner Aktivität nicht beeinflussenden Bedingungen limitiert. Sieht man von der Verwendung artifizieller Seitengruppen – wie azidierten Aminosäuren – ab, steht nur eine begrenzte Anzahl an Funktionalitäten bei den Aminosäureseitenketten zur Verfügung. Besonders interessant sind hierbei Amin- und Thiolgruppen von Lysin- oder Cysteinseitengruppen. Andere funktionelle Gruppen, wie Hydroxylgruppen (Tyrosin, Serin, Threonin) oder Carboxylgruppen (Glutaminsäure, Asparaginsäure, C-Terminus) werden selten modifiziert. Lysin besitzt ungefähr eine vierfach höhere natürliche Häufigkeit als Cystein, außerdem ist es häufiger auf der Oberfläche von Proteinen exponiert. Diese beiden Eigenschaften werden für unspezifische Konjugationen an Proteinen häufig ausgenutzt. Komplementär dazu ist Cystein eher im Kern und seltener auf der Proteinoberfläche vertreten. Dieses ermöglicht eine selektivere Konjugation. Ist eine ortspezifische Modifikation erwünscht, so lassen sich manche Proteine – wenn sie rekombinant produziert werden – durch gezielte Mutagenese verändern, um gewünschte Cysteine einzuführen. Das ist jedoch nicht bei allen Proteinen ohne Verlust der Aktivität möglich. Der Thiolgruppe steht eine Vielzahl möglicher Reaktionspartner zur reversiblen und nichtreversiblen Bindung zur Verfügung. Reversible Bindungen sind immer interessant, wenn Sonden zur Analytik eingeführt werden sollen (62). Hierfür werden Methanethiosulfonate oder Thiopyridyle verwendet, die mit Cysteinseitengruppen reagieren und Disulfidbrücken bilden. Mit Reduzierungsmitteln können diese Konjugate wieder gespalten werden, um das freie Protein erneut zu bilden. Zur Darstellung von nichtreversiblen Biokonjugaten an Thiolgruppen existieren drei verschiedene Klassen an reaktiven Reagenzien:  $\alpha$ -Halogencarbonyle, Vinylsulfone und Maleimide. Alle drei Klassen reagieren unter milden Bedingungen mit Cysteinen und bilden Thioetherbindungen. Maleimide werden im pH Bereich von 6.5 – 7.5 sehr schnell von Thiolen nukleophil angegriffen. Der Vorteil der Michael-System basierten Reagenzien – Vinylsulfone und Maleimide – ist die Selektivität gegenüber Thiolen. Sie werden – im Gegensatz zu  $\alpha$ -Halogencarbonylen – nicht von Histidin, Tyrosin oder Methioninseitengruppen umgesetzt (63). Lediglich bei pH-Werten über 8.5 ist die Reaktion mit pri-

---

mären Aminen gegenüber Thiolen bevorzugt. Des Weiteren sind die  $\alpha$ -Halogen-carbonyle toxischer, aber in intrazellulärer Umgebung stabiler als die Maleimidbausteine (64).

### 2.3.2 Biokonjugationen mit synthetischen Polymeren

Neben den Biokonjugationen mit kleinen organischen Molekülen sind auch Polymer-Protein-Konjugationen von erheblicher Relevanz (1, 3, 43, 65–69). Hierbei werden synthetische und biologische Makromoleküle verbunden und ihre divergierenden Eigenschaften kombiniert. Polymere können beispielsweise die Halbwertszeit der Konjugate im Blut erhöhen oder passives *Drug Targeting* ermöglichen. Beim ersten publizierten Polymer-Protein-Konjugat, Davis *et al.* 1977 (70, 71), wurde beschrieben, wie die Immunogenität von *Bovine serum albumin* (BSA) durch Konjugation mit Methoxypolyethylen verändert wurde.

Bei der Synthese der Biokonjugate kann zwischen der *grafting from* und der *grafting to* Methode unterschieden werden. *Grafting from* beschreibt den Aufbau des Polymers am Biomolekül. Dafür werden Initiatoren oder Monomermoleküle zum Beispiel an einem Protein gebunden, anschließend wird die Polymerkette daran aufgebaut (72). Bei *grafting to* wird zuerst das Polymer dargestellt und anschließend über bekannten Kupplungsmethoden an das Protein konjugiert. Überdies besteht die Möglichkeit einer nichtkovalenten Polymer-Protein-Bindung. Hierfür werden starke Ligand-Protein-Bindungen benötigt, wie z.B. Streptavidin/Avidin-Biotin (73) oder Concanavalin A und Glycopolymere (74, 75).

Die wichtigere Methode ist *grafting to*. Wie bei anderen Biokonjugationen werden auch hier reaktive Gruppen (am Polymer) benötigt, die mit bestimmten Aminosäureresten kovalente Verbindungen eingehen können. Diese Gruppen können vor der Polymerisation vorhanden sein oder durch polymeranaloge Umsetzung nach der Polymerisation eingeführt werden. Letzteres ist relevant für Michael-Systeme wie Maleimide oder Vinylsulfone; diese würden sonst bei Polymerisationsreaktionen stören und Nebenreaktionen produzieren. Die proteinreaktive Gruppe kann terminal an telechelen Polymeren eingeführt werden, beispielsweise durch Endgruppenmodifizierung an RAFT-Polymeren (43, 44) oder durch Reaktionen an Seitengruppen der Polymerbausteine (76, 77).

Durch die Auswahl der Monomere für die Biokonjugate lassen sich vielfältige gewünschte Eigenschaften durch die Polymere übertragen. Die verwendeten Polymere sollten jedoch wasserlöslich, ungiftig und nicht immunogen sein. Polyethylenglycol bzw. Polyethylenoxid (abhängig von der Synthesemethode) stellt mit Abstand das meist verwendete Polymer auf diesem Gebiet dar (78, 79). Einige dieser Polymer-Protein-Konjugate, wie Oncaspar<sup>®</sup> oder Adagen<sup>®</sup>, haben bereits die Marktreife erreicht und werden als Polymere-Therapeutika eingesetzt. Andere potenzielle Polymere wie *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA), Poly(vinylpyrrolidin) (PVP) oder Hydroxyethylstärke (HES)

---

finden seltener Verwendung (80). Besonders beachtenswert ist die Verwendung von stimulussensitiven Polymeren wie PNIPAAm oder pH-sensitiven Bausteinen wie Polyacrylsäuren oder Polyvinylpyridin (1, 3). Außerdem können Biokonjugate aus unpolaren Polymerbausteinen dargestellt und als große amphiphile Strukturen verwendet werden (81–83). Diese *Giant Amphiphilics* bestehen aus einer polaren Kopfgruppe (dem Biomolekül) und einem unpolaren Rest, z.B. Polystyrol. Diese Biohybride bilden, ähnlich wie kleinere Amphiphile, vesikuläre Strukturen aus und könnten für biomedizinische Anwendungen, z.B. als Nanocarrier, verwendet werden (84, 85).

Polymer-Biomolekül-Hybride sind für diverse Anwendungen mit biologisch-medizinischem Hintergrund interessant. DNA-Konjugate können beispielsweise als Biosensoren oder als alternative Gentransportsysteme verwendet werden. Polymere Nanopartikeln können auch Antigene, Antikörper oder Proteinen einkapseln und wieder freilassen (86–90). Dieses macht sie für die Entwicklung von Impfstoffen interessant. Eine Anwendung von Polymer-Peptide-Konjugaten als Virostatikum wurde 2012 von Klok *et al.* (91) gezeigt. Die Peptide mimen Proteinfragmente des Anti-HIV Antikörper IgG1 b12 und binden an gp120 – ein Glykoprotein auf der Oberfläche des HI-Virus – wodurch das Eindringen des Virus in die Zelle verhindert wird. Protein-Polymer-Konjugate werden ebenfalls häufig als Transportsysteme verwendet, beispielsweise als Wirkstofflieferant (hier ein Enzym); dabei werden die Größe der Polymere und ihre Schutzfunktion ausgenutzt. Die Konjugate haben eine höhere Halbwertszeit als das einzelne Protein und durch den EPR-Effekt (enhanced permeability and retention) können insbesondere porösere Tumorgewebe penetriert werden. Konjugationen mit stimulussensitiven Polymeren stellen eine interessante Erweiterung für Protein-Polymer-Konjugate und mögliche Anwendungen dar. Hier sind insbesondere pH-, temperatur- und enzymsensitive Systeme interessant. So lassen sich die Transportsysteme besser kontrollieren oder auch andere Anwendungen erschließen. Bei den Biokonjugaten mit sensitiven Polymeren ist der Ort der Konjugation entscheidend. In Nähe zum Aktivzentrum lässt sich die aktive Seite durch das kollabierte Polymer verdecken. So sind Biokatalysatoren möglich, die auf einen äußeren Stimulus reagieren (8–10, 92, 93). Eine andere Anwendung stellt die Proteinaufreinigung und Substratabtrennung dar (94).



---

## 2.4 Histon-Deacetylasen und Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase (HDAH)

Acetylierungs- und Deacetylierungsreaktionen an Histonen beeinflussen die Transkription, und somit die Genexpression, weshalb sie einen großen Einfluss auf viele biologische Faktoren haben (95). Sie laufen an der Oberfläche der Histone, an  $\epsilon$ -Aminogruppen bestimmter Lysine ab und induzieren dort einen Wechsel der Ladung. Dadurch wird die Bindung der DNA an den Histonen reguliert. Diese beiden Reaktionen werden von den großen Enzymfamilien Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) durchgeführt. HDACs gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen – in ihrem Aktivzentrum wird die Acetylgruppe entfernt – und sie können selbst in vier Unterklassen eingeteilt werden, drei Zink-abhängige- (Klassen I, II und IV) und eine NAD-abhängige-Klasse (Klasse III) (95, 96). Die Einteilung erfolgt abhängig von der Sequenzverwandschaft, somit aufgrund der Ähnlichkeit bei den Domänen. Zusammen mit den Sirtuinen aus der Klasse III sind 18 verschiedene Histon-deacetylasen bekannt. Obwohl sich die HDACs bezüglich ihres Targets kaum unterscheiden, hat jedes eine spezifische Aufgabe. Knockout-Experimente an Mäusen belegten diesen Einfluss (95). HDACs sind entscheidend für viele Signalwege im Zellsystem, zum Beispiel der Zellzyklus (97). Ihr epigenetischer Einfluss bei der Genexpression durch die Deacetylierung der Histone konnte in Verbindung mit der Entstehung verschiedener Krebsarten gebracht werden (98). Dadurch wurden sie zu einem vielversprechenden Zielprotein in der Krebsforschung. Die Charakterisierung der Multienzymkomplexe, in denen sie häufig vorkommen, ihrer natürlichen Substrate und ihrer möglichen Inhibitoren (HDACi) sind Gegenstand aktueller Krebsforschung. Dieses Interesse betrifft die ganze Superfamilie der Histon-Deacetylasen inklusive der bakteriellen Homologen, wie der Acetylpolyamin-amidohydrolase (APAH), dem Histone-Deacetylase-like Protein (HDLP) und der Histone-Deacetylase-ähnliche Amidohydrolase (HDAH). Da alle ähnliche Aktivzentren besitzen, sind die Erkenntnisse über die HDAC ähnliche Enzyme ebenfalls von großer Bedeutung. HDAH ist eine Amidohydrolase, die in einen *Bordetella/Alicagenes* Stamm FB188 gefunden und daraus isoliert werden konnte (99, 100). Das Enzym ist ca. 37 kDa groß, im Aktivzentrum wird ein Zinkion koordiniert und es besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu den HDAC Klassen I und II; die größte Ähnlichkeit besteht zu HDAC6. Dadurch kann HDAH auch durch diverse HDACi, wie Suberanilohydroxamsäure (SAHA, Vorinostat) oder Trichostatin A, inhibiert werden. Des Weiteren wird die Aktivität von HDAH durch die Variation des pH-Bereiches nur wenig beeinflusst. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu den eukaryotischen HDACs, die einfache Produktion durch rekombinante Genexpression, ihre geringe pH-Abhängigkeit, das variable Substratspektrum und ihre Unabhängigkeit gegenüber Cofaktoren ist HDAH als möglichen Biokatalysator – auch hinsichtlich technischer Anwendungen – sehr interessant (99).



---

## 2.5 Lichtschaltbare Proteine

Lichtsensitive Proteine sind in der Flora und Fauna weit verbreitet. Biologische Prozesse, wie Phototropismus oder Photosynthese (101), werden durch Photorezeptorproteine ausgelöst oder gesteuert. Das bekannteste Protein dieser Klasse ist Rhodopsin; dieses trägt Retinal als lichtschaltbares Molekül an einem Lysinrest (102). Das generelle Motiv ist bei den natürlich vorkommenden und bei artifiziell dargestellten lichtschaltbaren Proteinen das Gleiche: funktionelle Seitengruppen oder kovalent gebundene Moleküle reagieren auf bestimmte Lichtarten, führen dabei eine molekulare Änderung aus und induzieren somit eine Modulation am Protein. Dadurch ist es möglich, biologische Funktionen durch Emission von Licht zu steuern – im ultimativen Fall ist ein vollständiges Ein- und Ausschalten möglich (36).

Willner und Rubin beschrieben 1996 verschiedene Konzepte zur Darstellung von lichtschaltbaren Biomaterialien. Auf der ersten Ebene kann zwischen reversiblen und nichtreversiblen Prozessen unterschieden werden. Für die nichtreversiblen Prozesse werden „Caged“-Moleküle verwendet (32). Durch die Bestrahlung kommt es bei diesen Molekülen bzw. Molekülkonjugaten zu einer unumkehrbaren Photoschaltung; neue funktionelle Gruppen können zum Beispiel dadurch eingeführt werden (103). Drei Konzepte beschrieben Willner und Rubin für die reversible Photoschaltung von Biomolekülen. Die wichtigste und am häufigsten angewendete Strategie ist ein durch die Isomerisierung des Lichtschalters induzierter Wechsel in der Konformation des Biomoleküls. Dieses führt zu der angestrebten Änderung der Aktivität oder Funktionalität des Biomoleküls. Die Einbettung des Proteins in eine lichtschaltbare Matrix oder die Verwendung von lichtschaltbaren Inhibitoren sind andere mögliche Varianten.

Lichtschaltbare Biomoleküle können durch die Biokonjugation diverser Photochromen erzeugt werden (vgl. Kap. 2.1.2 und 2.3). Die Auswahl des Biomoleküls bestimmt dabei den biologischen Prozess, der kontrolliert werden soll (104). Interessant sind Modifikationen an den Biopolymeren, wie DNA (105–108), RNA (109, 110), Polypeptide (111–113) und Proteine (9, 10, 114–118), um so einen entscheidenden Einfluss auf mannigfaltige biologische Prozesse zu erlangen. Die Funktionalitätsänderung bei den biokonjugierten lichtschaltbaren Proteinen kann generell durch drei verschiedene Mechanismen erreicht werden: a) der Lichtschalter wird als Vernetzer („*cross-linker*“) eingesetzt und die Isomerisierung führt direkt zu einer Konformationsänderung am Protein (119–123), b) durch die Isomerisierung des Photochromes am Enzym ändert sich die Polarität auf der Proteinoberfläche und dieses induziert die Konformationsänderung (114, 124–129) oder c) durch den Photoswitch eines konjugierten Liganden, der die aktive Seite blockiert. Letzteres wurde von Trauner *et al.* mit dem Begriff *photoswitchable affinity labeling* (PAL) beschrieben (116, 118, 130). Das Vernetzerkonzept lässt sich von den anderen beiden Konzepten differenziert betrachten – hier werden zwei funktionelle Seitengruppen


---

und ein maßgeschneiderter Baustein benötigt. Zur Darstellung des verbindenden Bausteines ist außerdem eine exakte Kenntnis der Abstände zwischen den funktionellen Seitengruppen erforderlich.

Das PAL-Konzept stellt eine Weiterentwicklung der lichtschaltbaren Biokonjugate dar. Hierbei maximiert ein Ligand, der an der aktiven Seite bindet und diese somit blockiert, die Aktivitätsänderung. Die Geometrie zwischen Photochrom, Linker, Ligand und Aktivzentrum ist dabei von enormer Bedeutung, und kleine Veränderungen der Linkerlänge wirken sich auf die Effektivität des Systems aus (131). Bei der Modifikation ohne inhibierenden Liganden kann zwischen einer zufälligen Konjugation und einer gesteuerten Konjugation unterschieden werden. Bei der zufälligen Modifizierung werden ein oder mehrere funktionelle Gruppen auf der Proteinoberfläche mit dem Photoschalter modifiziert (124, 126, 132). Die Photoschaltung hat dabei meist nur einen allosterischen Einfluss auf die Aktivitätsänderung, dennoch können hohe relative Aktivitätsänderungen beobachtet werden. Zur Optimierung der Photoschaltung kann die Konjugation in der Nähe der aktiven Seite durchgeführt werden. Prinzipiell ist dieses über drei verschiedene Wege möglich (104): a) *De Novo* Synthese des Enzyms, zum Beispiel an der Festphase, und Einbau eines photochromen Aminosäurederivates, b) Biosynthese des Enzyms und Einbau eines photochromen Aminosäurederivates oder c) punktuelle Mutation einer reaktiven Aminosäure, gefolgt von der Konjugation mit dem Lichtschalter. Bei allen Modifikationen muss die Funktionalität des Proteins beachtet werden. Manche Derivatisierungen führen zu einer Minderung der Aktivität bis hin zum vollständigen Verlust. Bei der Punktmutation sind, neben der Lage der Aminosäure, auch die strukturgebenden Eigenschaften bzw. die Position der Aminosäure im Sekundärstrukturelement entscheidend. Mutationen in einer Helix oder im  $\beta$ -Faltblatt können dessen Strukturelement stören bzw. deren Bildung verhindern. Ferner könnte die funktionelle Seitengruppe der eingeführten Aminosäure schwieriger zugänglich sein. Weiterhin müssen Nebenreaktionen mit anderen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden.

Die Darstellung von lichtschaltbaren Biomakromolekülen ist eine herausfordernde Aufgabe, für die es aktuell noch keine generelle Methode gibt. Abhängig von der Anwendung sind verschiedene Ansätze denkbar, wobei der Fokus auf den Lichtschalter oder auf die Position des Lichtschalters gerichtet werden kann. Beides sind entscheidende Faktoren für die Effektivität des Systems und sollten bei Bedarf optimiert werden. Die Erfolg versprechendste Methode ist die Einführung einer reaktiven Aminosäure in der Nähe des Aktivzentrums, gefolgt von deren Funktionalisierung. Die Modifizierung geht allerdings häufig mit einer Verminderung der Aktivität und einer Änderung des photostationären Zustands der photochromen Substanz einher. Funktionierende Bioschalter zeigen die Aktivitätsänderungen durch die Modulation der enzymkinetischen Konstanten  $K_M$  (Michaelis-Menten-Konstante) und  $k_{cat}$  (katalytischen Konstante) an.

Durch die Vorteile der räumlichen und zeitlichen Auflösung, der Variation der Intensität und der Fähigkeit, in Gewebe eindringen zu können, ist Licht als Stimulus für Biomakromoleküle sehr at-



---

traktiv. Die photoschaltbaren Biokatalysatoren bieten viele mögliche Anwendungen in der Diagnostik oder als Biosensoren, auch therapeutische Anwendungen sind denkbar. Biologische Prozesse reversibel kontrollieren zu können, ist ein faszinierendes Ziel bei der Erforschung dieser Systeme. Dadurch gewonnene Erkenntnisse können direkt oder indirekt – bei der Entwicklung von Wirkstoffen – für medizinische Anwendungen genutzt werden.

### 3 Zielsetzung und Strategie

Lichtschtbare Proteine sind ein attraktives Forschungsgebiet. Die Vorteile von lichtschaltbaren Molekülen, wie das nichtinvasive und bioorthogonale Eingreifen in ein System durch die Verwendung von Licht als schaltende Komponente, werden mit einer biotechnologischen Anwendung verknüpft. Die so darstellbaren schaltbaren Biokatalysatoren sind für diverse Anwendungen, zum Beispiel eine enzymatische Produktion (133–136) oder in einem diagnostischen Testsystem, sehr interessant.

Diese Biokonjugate lassen sich in drei Einheiten differenzieren: das eigentliche Protein, die lichtschaltbare Gruppe/Einheit sowie einem verbindenden Baustein. An jedes dieser Elemente gibt es verschiedene Anforderungen, die sie erfüllen müssen, um als gesamte Einheit agieren zu können.

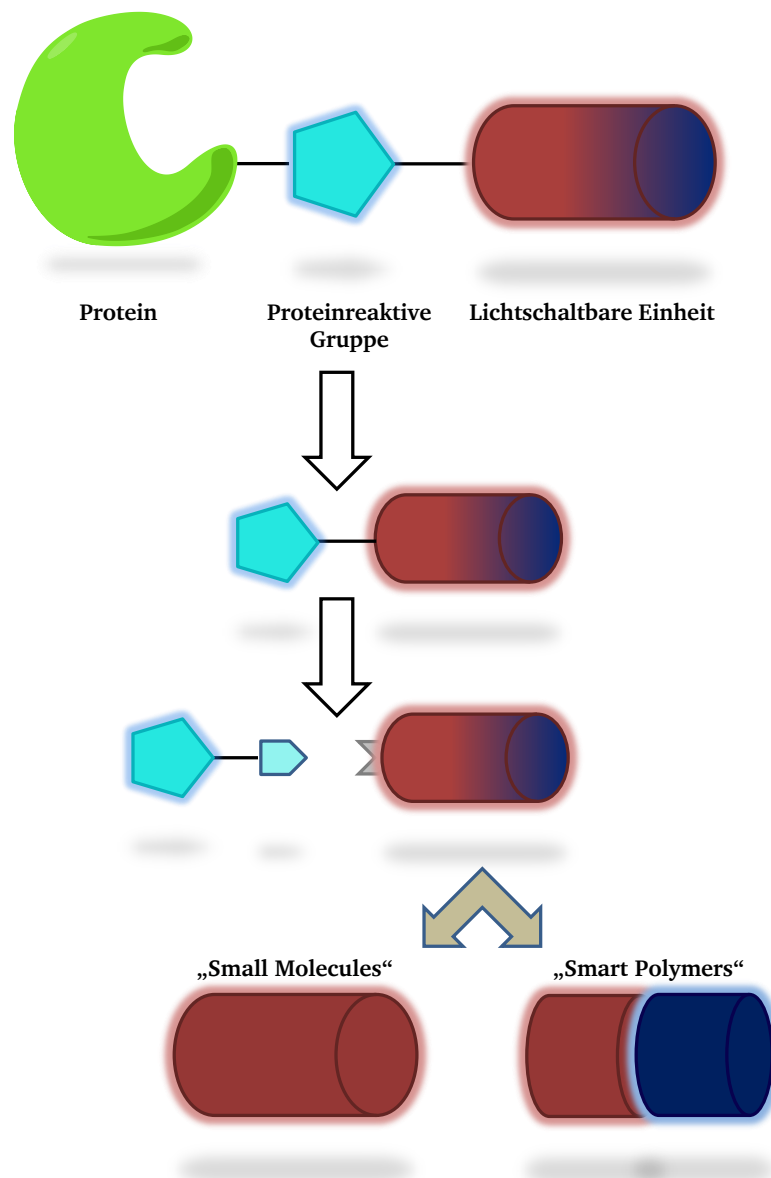


Abbildung 3-1: Retrosynthetische Konzept zur Darstellung von lichtschaltbaren Proteinen mit photochromen Substanzen oder photosensitiven „Smart Polymers“.

---

Für eine kovalente Bindung müssen Aminosäureseitenketten an der Proteinoberfläche (grün, Abbildung 3-1) modifiziert werden. Hier bieten sich wegen ihres nukleophilen Charakters Lysin- oder Cysteinreste besonders an. Während Lysin sehr häufig auch auf der Oberfläche vorkommt, sind Cysteinseitenketten eher selten. Falls keine Cysteingruppe auf der Oberfläche des Proteins vorhanden ist, lässt sich diese durch ortspezifische Mutagenese einführen (114, 137). Dadurch sind Cysteingruppen interessante Ziele, um selektive Modifikationen einzufügen. Thiolgruppen reagieren unter milden Bedingungen (Raumtemperatur, pH 6.5 – 8.0) mit  $\alpha$ -Halogencarbonylverbindungen, Vinylsulfone und Maleimide unter Ausbildung irreversibler Thioether- bzw. 3-Thiosuccinimidyletherverbindungen. Die Verbindung vom Biomolekül zur lichtgesteuerten Einheit kann somit über eine Reaktion einer Maleimidkomponente mit einer Cysteinseitengruppe auf der Oberfläche erfolgen.

Für die lichtschtaltbare Einheit werden lichtschtaltbare Moleküle benötigt. Azobenzen ist das am häufigsten verwendete Molekül dieser Art. Seine einfache und schnelle Isomerisierung, die starke Dipolmomentänderung und die kostengünstige Darstellung verschiedener Derivate zur Modifikation und Optimierung, machen es für eine Vielzahl von Anwendungen attraktiv. Die gesamte lichtschtaltbare Einheit (rot-blau, Abbildung 3-1) kann entweder direkt aus dem Azobenzenmolekül bestehen oder sie wird aus mehreren Bausteinen zusammengesetzt. Bei der zweiten Variante wird die Einheit durch Copolymere, bestehend aus lichtschtaltbaren und wasserlöslichen Bausteinen, generiert. Durch die Verwendung der Makromoleküle soll der Effekt der Lichtschaltung verstärkt werden (10). Diese Copolymere sollten auf zwei verschiedenen Wegen generiert werden: durch die einfache Polymerisation der Bausteine und durch polymeranaloge Umsetzung von wasserlöslichen und lichtschtaltbaren Bausteinen an Polypentafluorphenylacrylat.

Die dritte Komponente (türkis, Abbildung 3-1) ist die verbindende, somit proteinreaktive Gruppe. Sie bildet, in Kombination mit der lichtschtaltbaren Einheit, einen lichtschtaltbaren und biokonjugierbaren Baustein. Dieser soll, konjugiert an Biomolekülen wie Enzymen, einen Einfluss auf diese ausüben.

Stimulussensitive Polymere („*Smart Polymers*“) lassen sich nach ihren Stimuli differenzieren. Für die Arbeit mit Biomolekülen sind wasserlösliche Polymere von besonderer Bedeutung; Temperatur ist der meist genutzte Reiz bei diesen Polymeren. Die Trübungstemperatur, und somit der Bereich des kohärenten Verhalten kann, durch die Verwendung von polaren bzw. unpolaren Seitengruppe, variiert werden. Verwendet man lichtschtaltbare Gruppen, wie Azobenzen, befindet sich ein intramolekularer Schalter im Polymer. Durch Isomerisierung dieser Gruppen kann das Dipolmoment der Seitengruppe, und somit die Eigenschaft des gesamten Polymers, verändert werden. Durch die verschiedenen Isomerformen des Schalters sind somit verschiedenen Trübungstemperaturen möglich (siehe Abbildung 3-2). Liegt die Temperatur der Lösung zwischen den beiden Trübungstemperaturen, ist ein isothermes Schalten des Polymers durch Irradiation und Isomerisierung der photoschtaltbaren Gruppe denkbar.

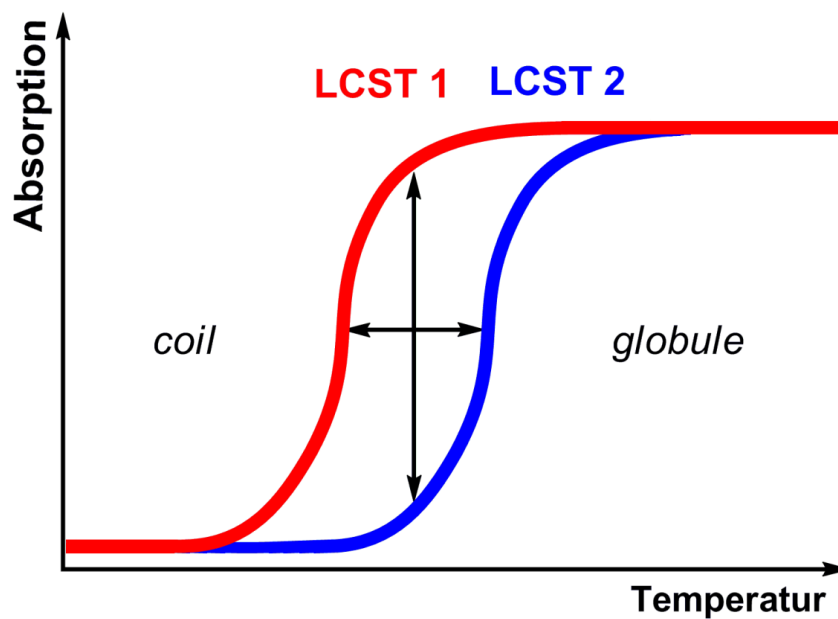


Abbildung 3-2: Schematische Abbildung der Absorption von lichtschtbaren Polymerlösungen, in Abhängigkeit der Temperatur und der Isomerform (rot und blau).

Zur Darstellung der biokonjugierbaren, temperatur- und lichtschtbaren Polymere sind verschiedene Seitengruppen in der Polymerstruktur notwendig. Neben der proteinreaktiven Gruppe werden eine lichtschtbare Gruppe, sowie eine temperaturschtbare Gruppe, die unter anderem auch die Löslichkeit des Polymers erhöht, benötigt. Polyalkylacrylamid Polymere sind für ihr temperatursensitives Verhalten bekannt. Polydimethylacrylamid (PDMAA) ist ein sehr hydrophiles Polymer, seine Lösungen zeigen keine Trübung innerhalb des Temperaturbereiches von Wasser. Durch Copolymerisation mit unpolaren Komponenten kann jedoch der Trübungspunkt verringert werden, um relevante Temperaturbereiche zu erreichen.

Jeder Monomerbaustein hat einen Einfluss auf die Polymerisation und somit auf die Einbauten der Bausteinen und der finalen Kettenlänge des Produkts. Weiterhin lassen sich proteinreaktive Gruppen, wie beispielsweise Maleimide, nicht durch eine radikalischen Polymerisation einbauen. Polymeranaloge Umsetzungen an einem reaktiven Polymer mit verschiedenartigen Bausteinen erfüllen diese Anforderung. Hiermit lässt sich ein vorher dargestelltes Polymer modifizieren und diverse Seitengruppen können nahezu quantitativ und ohne einen starken Einfluss auf den Polymerisationsgrad eingefügt werden. Die vollendeten Polymere können anschließend für die Biokonjugation an Proteinen eingesetzt werden, und somit als eventuelle Schalter für Biokatalysatoren, dienen.

### Chemikalien

Alle Ausgangsverbindungen wurden in der höchstmöglichen Qualität von kommerziellen Anbietern bezogen. Lösemittel wurden in Synthesqualität bezogen. Alle Monomere wurden vor Gebrauch destilliert. AIBN wurde vor Verwendung frisch umkristallisiert. THF und 1,8-Dioxan wurden frisch auf Natriumdraht destilliert und unter Argon und über Natrium gelagert, TEA wurde destilliert und über KOH gelagert. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 ( $40\ \mu\text{m} - 60\ \mu\text{m}$ ) von MACHEREY-NAGEL verwendet.

### Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC Messungen wurde am Arbeitskreis Biesalski, TU DARMSTADT durchgeführt. Sie erfolgten an einer Hewlett-Packard Agilent 1200 Series GPC mit zwei in Serie geschalteten Säulen. Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Für Methode A wurden PSS GRAM VS 3a und PSS GRAM AS 3b Säulen verwendet, die Detektion erfolgte an einen Brechungsindexdetektor 1200 Agilent RID. Als mobile Phase wurde DMF + 3 g/L LiCl mit einer Flussrate von 0.5 mL/min verwendet. Die Messung erfolgte bei 25 °C, die Kalibrierung wurde gegen PMMA Standards durchgeführt. Bei der Methode B wurden eine PSS SDV Vorsäule, gefolgt von einer PSS SDV linear M verwendet, die Detektion erfolgte an einen Brechungsindexdetektor 1200 Agilent RID. Als mobile Phase wurde THF mit einer Flussrate von 1.0 mL/min verwendet. Die Messung erfolgte bei 25 °C, die Kalibrierung wurde gegen Polystyrol Standards durchgeführt.

### Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR- und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren wurden mit einem BRUKER Avance300 (AC300) (300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , 282 MHz  $^{19}\text{F}$ )- und einem BRUKER DRX 500 (500 MHz  $^1\text{H}$ , 126 MHz  $^{13}\text{C}$ )-Spektrometer bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der Signale sind in Einheiten der  $\delta$ -Skala angegeben [ppm]. Als interner Standard dienten bei  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren die Resonanzsignale der Restprotonen des verwendeten deuteriertem Lösungsmittels [ $\text{CDCl}_3 = 7.26$ ); DMSO- $d_6$  ( $\delta_{\text{H}} = 2.50$ ); THF- $d_8$  ( $\delta_{\text{H}} = 1.72, 3.58$ )] bzw. die entsprechenden Resonanzsignale bei  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren [ $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}} = 77.16$ ); DMSO- $d_6$  ( $\delta_{\text{C}} = 39.52$ );]. Die Multiplizität der Signale wird durch folgende Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben.

---

## Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden mit Kieselgel 60 F254 beschichtete Aluminiumplatten der Firma MERCK verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) und ggf. folgenden Anfärbereagenzien:

Reagenz A: 0.66 g Ninhydrin in 100 mL in Ethanol und 1 mL konz. Essigsäure

Reagenz B: 5.00 g Eisen(III)chlorid in 100 mL Wasser und 1 mL konz. HCl

## Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS)

wurde an einer AGILENT Technologies Series 1200 Anlage mit einer AGILENT Eclipse XDB-C18 Säule durchgeführt. Als Eluent wurde ein Gradient aus Wasser + 0.1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure (B) verwendet: 5 – 95 % B von 2 bis 17 min, 95 – 5 % B von 20 bis 25 min. Die Detektion erfolgt im UV-Licht bei 254 nm.

## LCST-Werte

Durch Absorptionsmessung bei 650 nm der wässrigen Polymerlösung wurde die Trübungstemperatur bestimmt. Sie wurde durch eine Vierparameterregressionsanalyse der relativen Absorption gegen die Temperatur berechnet und ist als Wendepunkt definiert.

Die Temperatursteuerung erfolgte über einen wassergekühlten Peltier-Thermostat-Zellhalter (ETCS-761) der Firma JASCO. Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Temperaturführung und Temperaturmessung durch Methode A oder B. Methode A: Starttemperatur: 10 °C, Aufheizrate 5 °C/min, Absorptionsmessung nach 3 min bei der angefahrenen Temperatur. Es wurden die Temperaturen zwischen 10 °C und 70 °C in 1 °C Schritten eingestellt. Die Temperaturabnahme erfolgte am Zellhalter. Methode B: Starttemperatur: 10 °C; Endtemperatur: 70 °C, Heiz-bzw. Abkühlrate: 1 °C/min; vor Beginn der Aufheizphase wurde die Starttemperatur für 5 min gehalten; vor Beginn der Abkühlphase wurde die Lösung 2 min bei der Endtemperatur gehalten. Die Temperaturkontrolle wurde über die Temperatur am Zellhalter durchgeführt. Die Temperaturmessung erfolgte in der Küvette mit einem Temperatursensor (OPS-515, JASCO).

## UV/Vis-Spektroskopie

wurden an einem JASCO V-630 Spektrometer in Quarzküvetten ( $d = 1 \text{ cm}$ ) durchgeführt.



---

## Isomerisierung von Azobenzen

Die Bestrahlung der Proben erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden: Methode A (für die Polymerlösungen): Es wurde eine Superlite SUV-DC-E der Fa. LUMATEC mit einer 200 W Quecksilberdampfampe verwendet. Über einen Flüssiglichtleiter wurde das Licht auf die Probenlösung eingestrahlt. UV-Licht wurde durch die Verwendung eines Filters von 320 nm bis 400 nm emittiert, sichtbares Licht durch einen Filter bei 460 nm.

Methode B (für die Azobenzen-Proteinkonjugate):

UV-Licht: 6 W Handlampe der Firma HERAEUS; 364 nm;  $d = 6$  cm; 25 min ( $43 \text{ mJ cm}^{-2}$ )

Vis-Licht: 1 W LED der Fa. OSRAM; 464 nm; 25 min;  $d = 6$  cm ( $1.5 \text{ J cm}^{-2}$ )

## Bestimmung des $\text{IC}_{50}$ -Wertes

Zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes wird die Enzymaktivität in Form von relativen Fluoreszenzeinheiten pro Sekunde ( $\text{RFU s}^{-1}$ ) aus der linearen Steigung der Kinetik ermittelt, das Fluoreszenzhintergrundsignal subtrahiert und auf die Positivkontrolle, als relative Enzymaktivität in Prozent, normiert. Letztere wird gegen die logarithmierte InhibitorKonzentration aufgetragen und der  $\text{IC}_{50}$ -Wert mittels eines Vier-Parameter-Fit mit variabler Steigung ermittelt. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt; die gemittelte  $\text{IC}_{50}$ -Werte sind (wenn nicht anders angegeben) mit der Standardabweichung (standard deviation, SD) bestimmt.

## Polymerbiokonjugation an HDAH

Die Michael-Addition der Maleimidpolymere an HDAH wurde in einem Michael-Kopplungspuffer (MKP) durchgeführt. Zusammensetzung MKP: NaCl (150 mM),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (20 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (20 mM),  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  (1 mM), pH 7.2.

Wenn nicht anderes beschrieben wurden zu  $50 \mu\text{l}$  HDAH ( $100 \mu\text{M}$ )  $179 \mu\text{L}$  MKP und eine Polymer Lösung (Polymer in DMSO gelöst, um eine Konzentration 10 mM Maleimide zu erhalten) gegeben und eventuell bis  $250 \mu\text{L}$  mit DMSO aufgefüllt. Die Mischung wurde über Nacht (16 h) bei 300 rpm und  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden  $30 \mu\text{L}$  einer Dithiothreitol-Lösung (100-facher Überschuss DTT zu Maleimid) zugegeben. Die Lösung wurde 30 min bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend zentrifugiert ( $13.4 \times 1000$  rpm; 15 min). Der Überstand wurde abgenommen und mit  $720 \mu\text{L}$  MKP versetzt.

### 5.1 „Small Molecules“ zur Bindung an Proteine

#### 5.1.1 Azobenzenenalkylmaleimidderivate (AMDs)

Durch die Konjugation von lichtschaltbaren Molekülen an Proteinen lassen sich Einheiten einführen, die auf einen externen Stimulus reagieren können. Das photochrome Molekül kann durch Isomerisierung einen Einfluss auf das Protein nehmen, es in seiner Funktion und in seiner Struktur verändern und es gegebenenfalls kontrollieren. Dieser Einfluss ist jedoch von vielen Faktoren abhängig und lässt sich nur bedingt vorhersagen. Neben dem Ort der Biokonjugation – die Position der reaktiven Aminosäure – ist der Abstand zur Proteinoberfläche relevant. Kommerziell erhältliche biokonjugierbare Photochrome, wie 4-(*N*-Maleimido)azobenzen, haben einen festen Abstand zwischen der lichtschaltbaren Gruppe und der proteinreaktiven Gruppe. Zur Optimierung und für ein besseres Verständnis der Photoschaltung am Protein kann dieser Abstand jedoch von Bedeutung sein. Hierfür wurde eine Serie von Azobenzenenalkylmaleimidderivaten (AMDs) dargestellt. Die AMDs sind biokonjugierbare, lichtschaltbare, kleine organische Moleküle. Die proteinreaktive Gruppe (türkis) ist hierbei über einen Alkyllinker (blau) mit der photoschaltbaren Azobenzengruppen (rot) verbunden (siehe Abbildung 5-1).

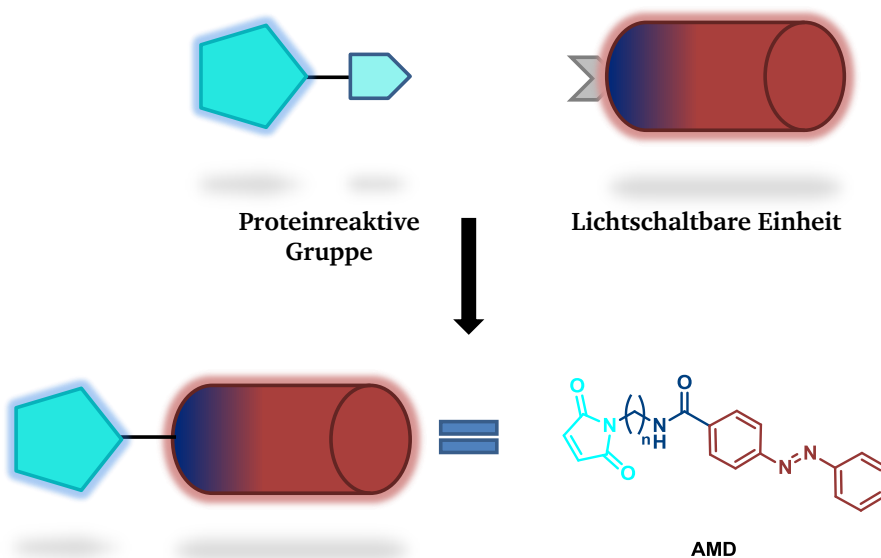
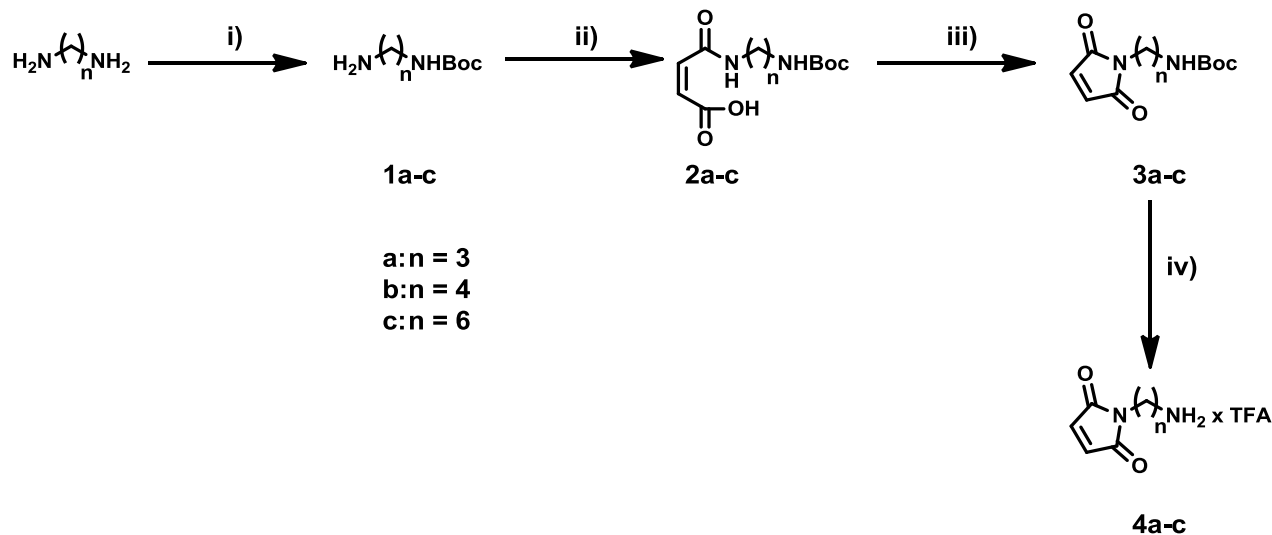


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung zur Synthese der Azobenzenenalkylmaleimidderivate.

Für die Darstellung der AMDs wurden verschiedene Aminoalkylmaleimide synthetisiert, die sich in ihrer Linkerlänge unterschieden. Anschließend wurden diese an einen voraktivierten Azobenzenbaustein gebunden. Über diesen Weg konnten die Derivate mit  $n = 2, 3, 4$  und  $6$  dargestellt werden (siehe Schema 5-1 und Schema 5-2). Für den Baustein mit dem kürzesten Alkyllinker wurde eine andere Strategie verfolgt und die Maleimidgruppe erst in der letzten Stufe generiert. Die Variation der Linkerlänge (131, 138) durch die Verwendung von unterschiedlichen Diaminen (139) ist eine bekannte Methode, um den Abstand zwischen zwei Einheiten zu variieren.

### 5.1.2 Synthese der AMDs über die Aminoalkylmaleimide

Maleimide sind thiolreaktive Verbindungen, diese Eigenschaft macht sie für Biomodifikationen an Sulfhydrylgruppen von Cysteinen auf Oberflächen von Proteinen sehr interessant. Die Konjugation erfolgt unter leicht basische Bedingungen und mit guten Ausbeuten. Diese Reaktivität gegenüber schwachen Nukleophilen beschränkt die Synthesewege zur Darstellung von Maleimidsonden. Aminoalkylmaleimide stellen eine Möglichkeit dar, um die Maleimidgruppe an andere Bausteine zu binden. Durch die Verwendung von verschiedenen Diaminen ist es dabei möglich den Abstand zwischen der Maleimidgruppe und des weiteren Molekülrestes zu variieren.

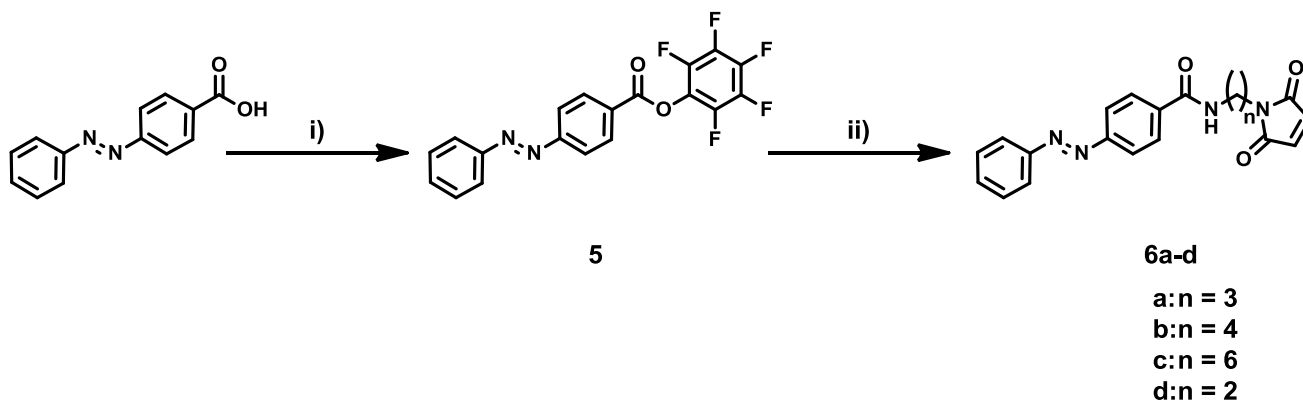


Schema 5-1: Darstellung der Aminoalkylmaleimide. i)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , DCM, 55 – 90 %; ii) Maleinsäureanhydrid, DCM 19 – 89 %; iii)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOAc}$ , 65 °C, 3 h, 30 – 43 %; iv) DCM:TFA (3:1).

Für die Darstellung der Aminoalkylmaleimide wurden verschiedene Diamine mit Di-*tert*-butyldicarbonat umgesetzt. Durch die Verwendung eines zehnfachen molaren Überschusses der Diamine konnte eine hohe Selektivität, mit hohen Ausbeuten, erreicht werden. Anschließend wurde die primäre Aminogruppe mit Maleinsäureanhydrid umgesetzt. Das dargestellte Maleinsäureamid muss

vor der Cyclisierung aufgereinigt werden, um den Überschuss an Maleinsäureanhydrid zu entfernen und eine Polymerisierung zu verhindern. Die Cyclisierung konnte thermisch in Essigsäureanhydrid oder durch die Verwendung des Kupplungsreagenz Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in Dimethylformamid (DMF) durchgeführt werden. Mit beiden Reaktionswegen wurden ähnlichen Ausbeuten erzielt. Durch die Entschützung des Amins mit Trifluoressigsäure konnten die Aminoalkylmaleimide als farblose Salze dargestellt werden.

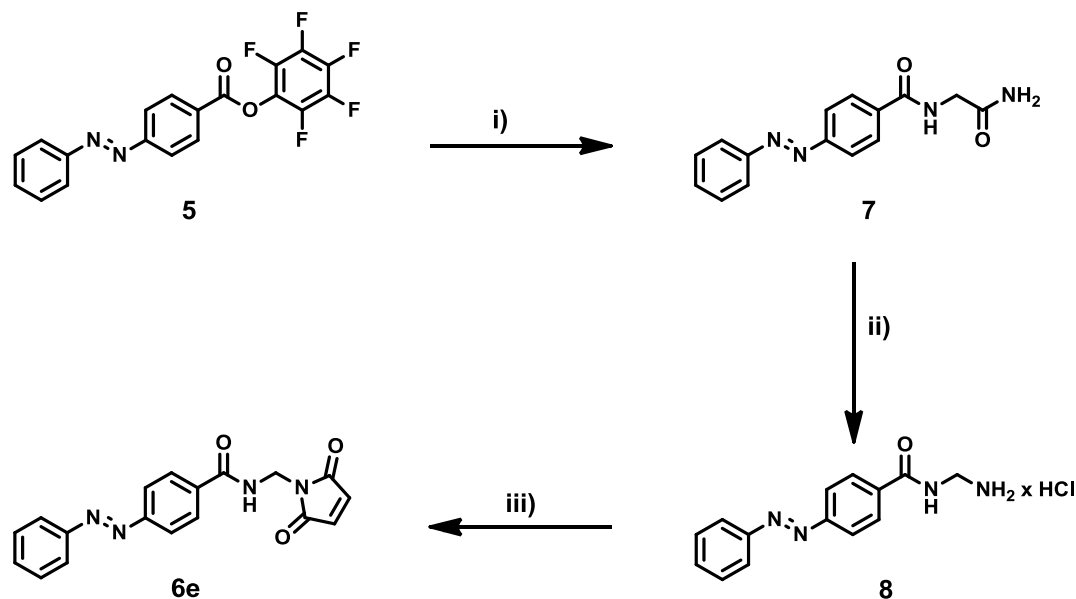
Für die Synthese der Azobenzalkylmaleimide (Schema 5-2) musste die Carboxylgruppe des 4-Carboxyazobenzens aktiviert werden, dies geschah mit Pentafluorphenyltrifluoracetat. Der dargestellte Azobenzaktivester **5** ist stabil, lagerbar und kann auch – wenn er im Überschuss eingesetzt wird – nach der Reaktion mit den Aminobausteinen wiedergewonnen werden. Die Aminoalkylmaleimide wurden mit dem Azobenzbaustein umgesetzt. Für die Synthese mit dem Propyllinker wurden wiederholt geringere Ausbeuten erzielt als mit bei den anderen Bausteinen. Eine Analyse des Reaktionsgemisches deutete auf eine Polymerisierungsreaktion zwischen einem dargestellten Azobenzalkylmaleimid **6a** und einem weiteren Aminopropylmaleimidbaustein **4a** hin. Diese Kettenlänge führte zu einem verstärkten nukleophilen Angriff des Aminopropylmaleimides an ein bereits dargestelltes Azobenzpropylmaleimid.



Schema 5-2: Synthese der AMDs **6a-d**. i) Perfluorophenyl 2,2,2-trifluoracetat, THF, TEA 73 – 80 %; ii) **4a – c**, TEA, THF 7 – 82 %. Kommerziell erhältliches 1-(2-Aminoethyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione Hydrochlorid (**AEMal**) wurde für die Synthese von **6d** verwendet.

Die Synthese des Azobenzmethylmaleimides **6e** konnte nicht analog der vorangegangenen Synthese durchgeführt werden. Die einfach geschützte Vorstufe ist nicht aus Methyldiamin darstellbar. Die direkte Umsetzung von Methyldiamin mit dem aktivierten Azobenzbausteines **5**, sowie die Umsetzung mit *N*-Methoxycarbonylmaleimid waren ebenfalls nicht erfolgreich. Aminomethylamidbausteine werden in der Literatur meist durch Hoffmann-Eliminierung mittels hypervalenter Iod-Verbindungen erzeugt. Hierbei wird ein Säureamid durch Decarbonylierung zu einem primären Amin umgewandelt.

Zur Darstellung des AMDs **6e** (Schema 5-3) wurde ein Säureamid **7** benötigt, welches nachfolgend mit [Bis(trifluoracetoxy)iod]benzol (PIFA) umgesetzt werden kann.



Schema 5-3: Synthese von AMD **6e**: i) Glycinamid Hydrochlorid, DMF, TEA 38 %; ii) PIFA, DMSO:H<sub>2</sub>O (1:1) 38 %; iii) 1. Maleinsäureanhydrid, DIEA, DCM; 2. EDC, HOBT, DMF, 27 %.

In der ersten Stufe wurde Glycinamid mit dem Azobenzenbaustein **5** umgesetzt, anschließend erfolgte die Decarbonylierung durch PIFA in einer Wasser/DMSO-Lösung. In der Literatur wird die Decarbonylierung in Wasser beschrieben, das entstehende primäre Amin wird dann als Hydrochlorid gefällt (140, 141). Bei hydrophoben Molekülen sind niedrige Ausbeuten für diese Reaktion bekannt. Da die Vorstufe **7** nicht in Wasser gelöst werden konnte, wurde die Reaktion in einer Wasser/DMSO-Lösung durchgeführt; da Wasser auch als Reaktant benötigt wurde. Der enthaltene DMSO-Anteil erniedrigte aber die Ausbeute beim Ausfällen des Hydrochlorides. Außerdem konnte das Edukt **7** nicht vollständig entfernt werden, sodass es im Reaktionsgemisch der nachfolgenden Stufe vorhanden blieb, aber die Reaktion nicht beeinflusste. Der erhaltene Aminobaustein **8** wurde anschließend mit Maleinsäureanhydrid zum Maleinsäureamid umgesetzt. Zum Schluss erfolgte der Ringschluss zum Maleimid **6e** mit den Kupplungsreagenzien EDC und HOBT.

## 5.2 Smart Polymers zur Bindung an Proteine

### 5.2.1 Copolymere mit NHS-Aktivestergruppen

Die Idee der lichtschtbaren und kovalent am Protein gebundenen Moleküle lässt sich auch auf Makromoleküle erweitern. Polymere können durch radikalische Polymerisation hergestellt werden. Und durch die Verwendung von diversen Monomerbausteinen lassen sich verschiedene Eigenschaften einbauen und variieren. Sensitive Seitengruppen, wie Maleimidgruppen, die in Gegenwart von Radikalen zerstört werden bzw. ebenfalls polymerisieren, müssen nach der Polymerisation eingebaut werden. Eine Möglichkeit diese Bausteine einzufügen ist durch polymeranaloge Umsetzung an Polymeren mit Aktivesterseitengruppen.

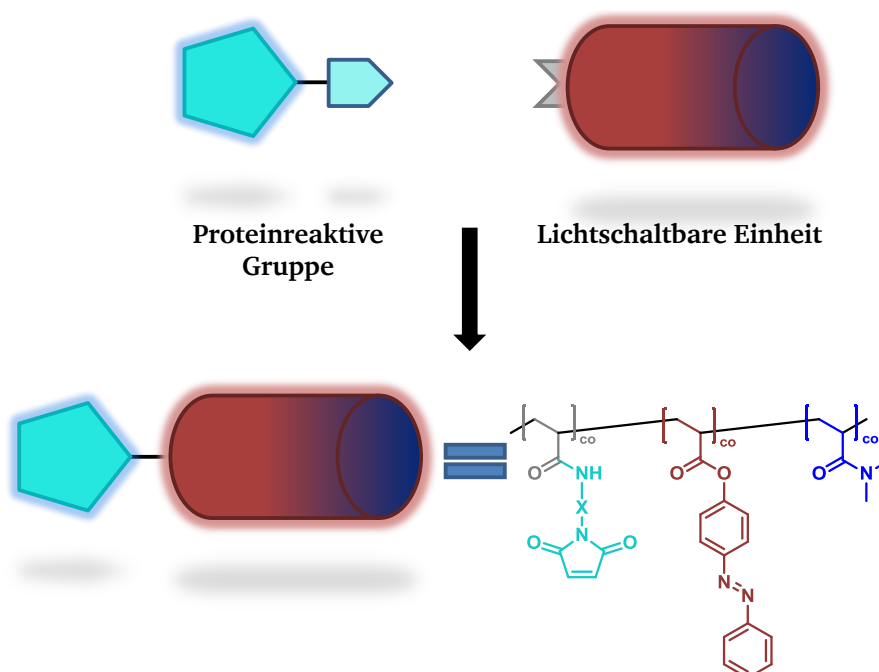
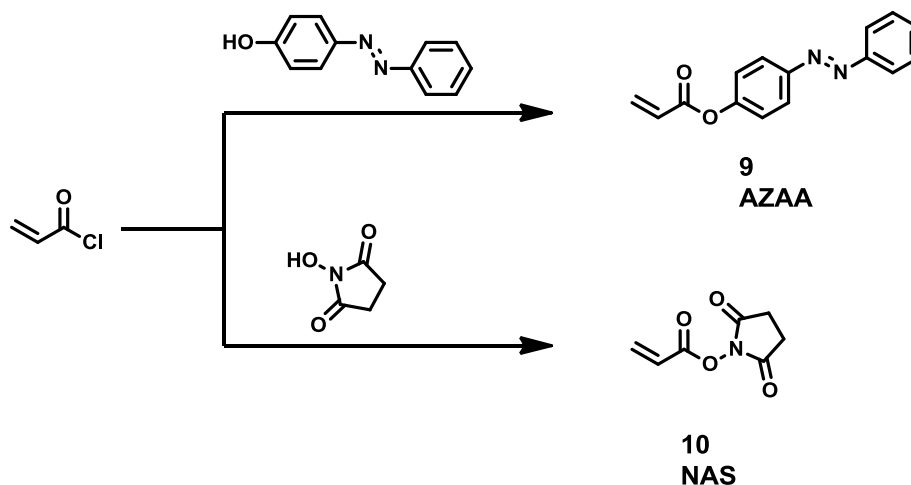


Abbildung 5-2: Schematische Darstellung zur Synthese von Polymeren mit proteinreaktiven Seitengruppen durch polymeranaloge Umsetzung.

#### 5.2.1.1 Synthese der Bausteine

Für die Synthese der lichtschtbaren Polymereinheit mit Aktivestergruppen werden Acrylbausteine, wie (*E*)-4-(phenyldiazenyl)phenyl acrylat (**9**, **AZAA**) oder 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl acrylat (**10**, *N*-Acryloxysuccinimid; **NAS**), benötigt (Schema 5-4). Beide Monomere konnten durch Umsetzung

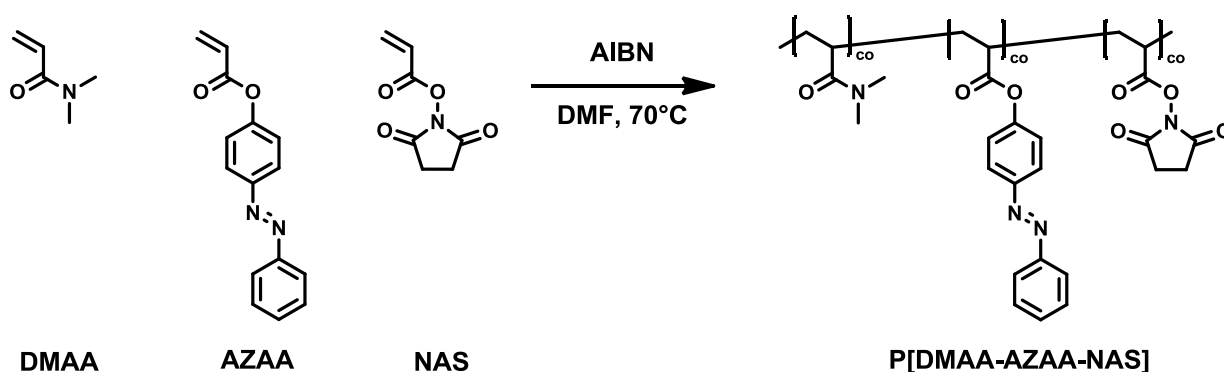
des korrespondierenden Alkohols mit Acryloylchlorid in akzeptablen bis sehr guten Ausbeuten hergestellt werden (99 % AZAA; 56 % NAS).



Schema 5-4: Synthese der Monomerbausteine **9 (AZAA)** und **10 (NAS)** ausgehend vom Acrylsäurechlorid.

#### 5.2.1.2 Synthese der Aktivestercopolymere P[DMAA-AZAA-NAS]

Zur Darstellung eines licht- und temperaturschaltbaren Aktivestercopolymers wurden die produzierten Bausteine **AZAA** und **NAS** mit dem kommerziell erhältlichen *N,N*-Dimethylacrylamid (DMAA) umgesetzt (Schema 5-5). Das verwendete Amidmonomer ist für das temperatursensitive Verhalten der Polymere in wässrigen Lösungen verantwortlich. Dieses entsteht jedoch nur in Gegenwart von unpolaren Copolymerbausteinen wie Azobenzenacrylamid (**9, AZAA**).



Schema 5-5: Synthese der P[DMAA-AZAA-NAS] Polymere.

Die Polymere wurden durch freie radikalische Polymerisation mit AIBN als Radikalstarter in Dimethylformamid dargestellt. Zur Aufreinigung wurden sie in Diethylether gefällt und im Vakuum getrocknet. Die Charakterisierung der Zusammensetzung erfolgte über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, sowie

die Molmassenbestimmung über GPC. Die Zusammensetzung der Komponenten konnte durch die Integration und das Verhältnis charakteristischer Signale im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum bestimmt werden (siehe Abbildung 5-3). Die neun Protonen der Azobenzengruppe zeigen klare Signale im Bereich von 8.3 ppm bis 7.3 ppm, diese wurde als Referenz gesetzt, um die übrigen Gruppen zu quantifizieren. Die Protonen des Polydimethylacrylamid erscheinen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zwischen 3.3 – 1.0 ppm. Innerhalb dieses Bereiches liegen ebenfalls die Protonen des Polymerrückgrates von Azobenzenacrylat und die der komplette *N*-Acryloxysuccinimidgruppe. Während die Protonen des AZAA-Bausteines herausgerechnet werden können, stellt die Überlagerung der Protonen des NAS-Bausteines, insbesondere der vier charakteristischen Protonen des Succinimidgruppe, ein Problem dar. Für die Berechnung der Zusammensetzung wurde von einem Anteil des eingebauten **NAS** ausgegangen, der dem eingesetzten Anteil entspricht (Tabelle 5-1).

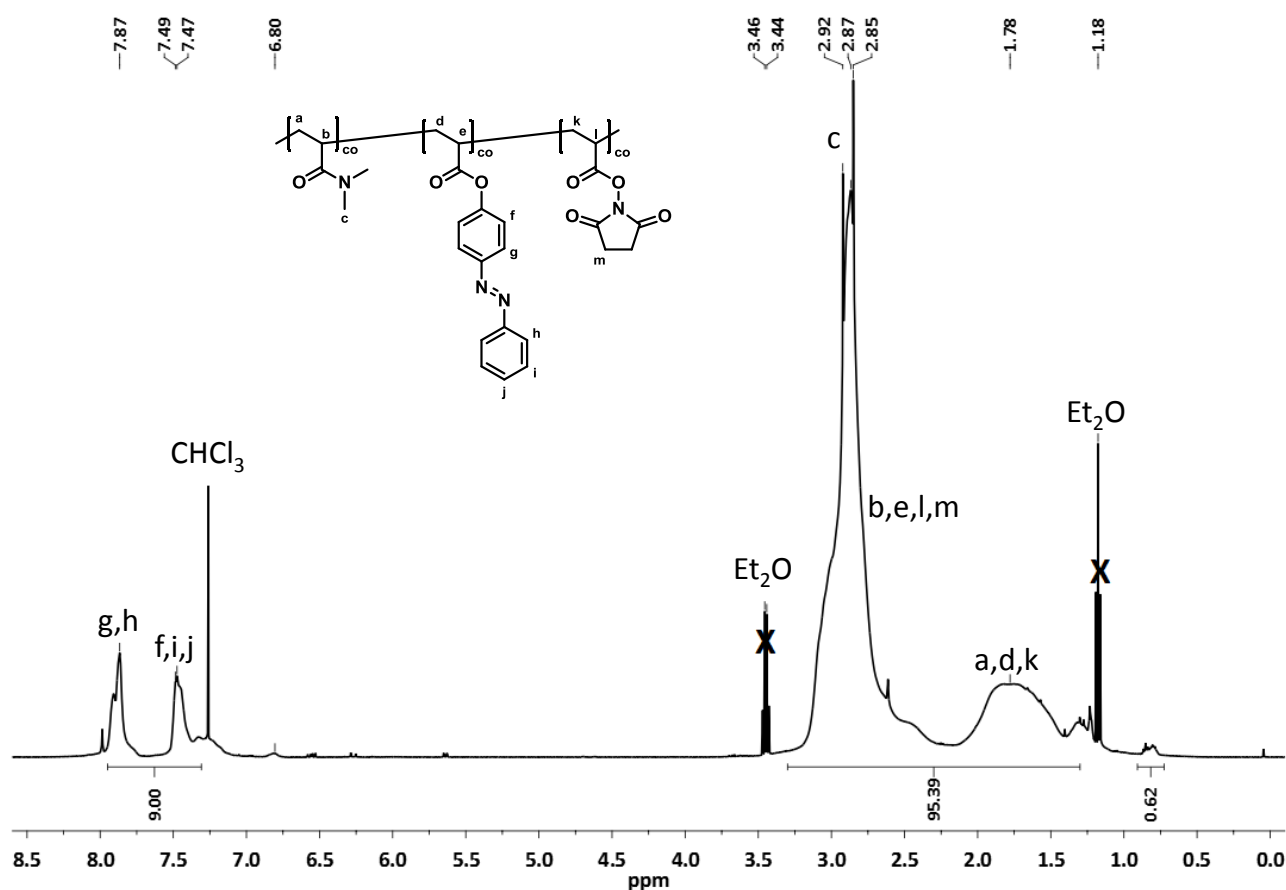


Abbildung 5-3:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Copolymers **P[DMAA-AZAA-NAS] 8** in  $\text{CDCl}_3$ .



Tabelle 5-1: Dargestellte **P[DMAA-AZAA-NAS]** Copolymere und ihre bestimmte Zusammensetzung, Ausbeute und Molmasse.

P[DMAA-AZAA-NAS]	DMAA		AZAA		NAS	Ausbeute	$M_n^a$	$M_w/M_n$
	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	ber.:			
	/%						/kDa	
<b>1</b>	88.0	87.4	10.0	10.6	2.0	15	10.7	2.2
<b>2</b>	92.0	92.9	6.0	5.1	2.0	47	25.6	2.3
<b>3</b>	90.5	90.1	7.5	7.9	2.0	46	18.1	2.8
<b>4</b>	89.5	88.7	8.5	9.3	2.0	40	15.2	3.6
<b>5</b>	90.5	87.0	8.5	10.0	3.0	44	20.9	2.5
<b>6</b>	88.5	89.6	8.5	9.4	1.0	25	18.1	2.1
<b>7</b>	91.4	90.0	8.6	10.0	-	27	15.5	6.7
<b>8</b>	81.5	81.7	8.5	8.3	10.0	28	14.6	8.3
<b>9</b>	86.0	85.9	11.0	11.1	3.0	23	13.1	2.4
<b>10</b>	85.0	85.0	12.0	12.0	3.0	31	12.5	2.4
<b>11</b>	82.0	81.3	15.0	15.7	3.0	22	17.9	2.0
<b>12</b>	77.0	76.5	20.0	20.5	3.0	12	13.5	1.9
<b>13</b>	84.0	81.4	13.0	15.6	3.0	7	8.9	2.3
<b>14</b>	83.0	79.6	14.0	17.4	3.0	21	14.5	2.0
<b>15</b>	89.0	85.9	10.0	13.1	1.0	16	17.6	2.0
<b>16</b>	84.0	81.2	15.0	17.8	1.0	13	14.8	1.9
<b>17</b>	85.0	84.8	10.0	10.2	5.0	42	18.9	2.7
<b>18</b>	80.0	80.2	10.0	9.8	10.0	19	6.6	2.9
<b>19</b>	87.0	88.3	12.0	11.7	1.0	33	18.2	2.4
<b>20</b>	86.0	87.3	12.0	12.7	2.0	18	11.1	2.8

a: bestimmt nach Methode A.

### 5.2.1.3 NAS-Nachweis

#### NAS-Nachweis mittels $^{13}\text{C}$ -NMR

Da der Nachweis des eingebauten NAS-Bausteines **10** über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie nicht möglich war, wurde nach alternativen Nachweismethoden – direkt oder indirekt – gesucht. Eine direkte Methode ist der Nachweis über  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. Hierfür wurden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren und  $^{13}\text{C}$ -NMR-DEPT Spektren des Aktivstermonomers **10** und des Polymers **P[DMAA-AZAA-NAS] 8** aufgenommen und die Signale der Kohlenstoffatome beobachtet, insbesondere die der beiden Methylenkohlenstoffe der NHS-Gruppe (siehe Abbildung 5-4).

Die Signale des NHS-Monomers **10** sind in Abbildung 5-4 A und B eindeutig zuzuordnen. Die Signale der Carbonylkohlenstoffatome des Succinimids und die der Carbonylgruppe des Acrylates traten bei 169.17 ppm und bei 161.15 ppm auf, allerdings nur im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (A). Für die Alken-Gruppe konnten die Signale bei 136.23 ppm und 123.05 ppm zugeordnet werden; der terminale Kohlenstoff ist durch das negative Signal in Abbildung 5-4 B zu erkennen. Das Signal der beiden Methylenkohlenstoffe der NHS-Gruppe liegt bei einer Verschiebung von 25.70 ppm. Die Spektren des Polymers (Abbildung 5-4 C und D) weisen deutlich mehr Signale auf. Die Signale des NAS-Bausteines **10** sind weniger intensiv, da der Baustein nur zu ca. 10 % (Mol-%) im Polymer vorhanden ist. Neben denen der Carbonylkohlenstoffatome bei 174 – 169 ppm erscheinen die ersten Signale des Azobenzens bei ca. 152 und 150 ppm (C-N=N-C). Weitere Peaks (auch im DEPT-Spektrum) erhält man für die Aromaten zwischen 131 und 122 ppm. Die Signale des Polymerrückgrates und der Methylgruppen des DMAA treten bei ca. 37 bis 35 ppm auf. Und die gesuchten Signale der beiden Methylenkohlenstoffe des NAS-Bausteines erscheinen wieder bei 25.75 ppm und bei 25.61 ppm im DEPT-Spektrum. Die Succinimidgruppe wurde in allen Spektren detektiert, sodass der Einbau von **10** (NAS) nachgewiesen werden konnte. Jedoch war eine quantitative Charakterisierung nicht möglich.

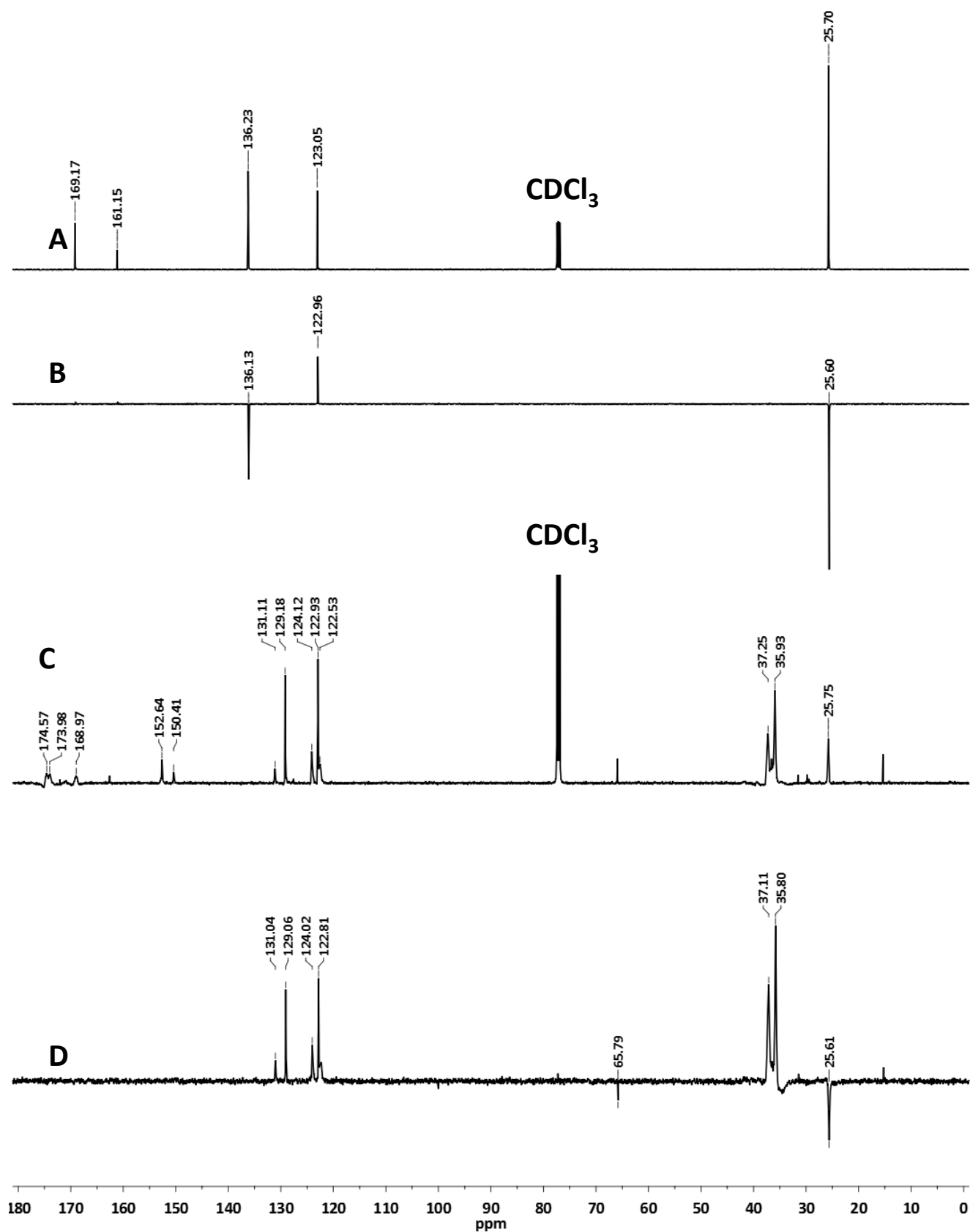
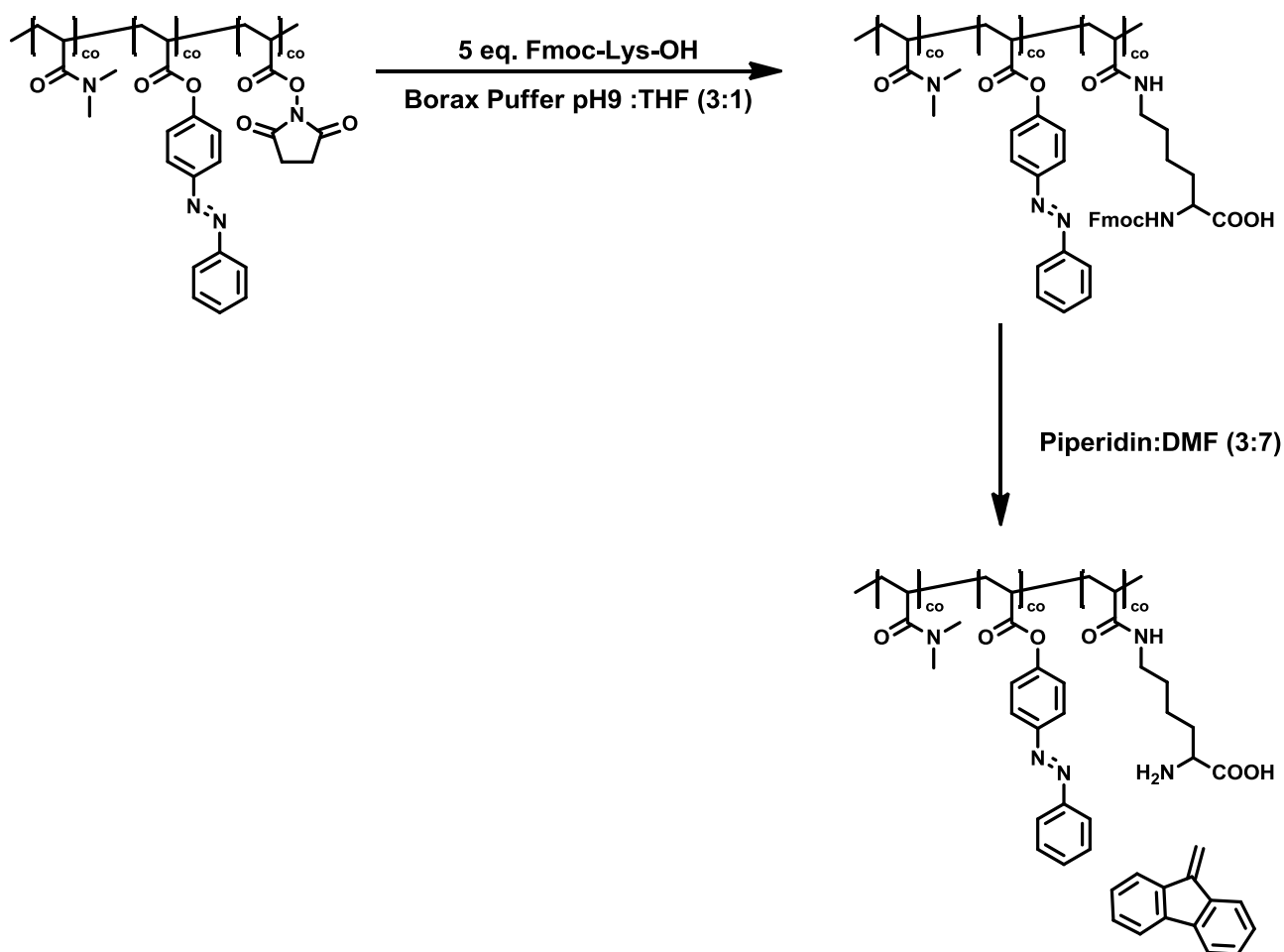


Abbildung 5-4:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren und  $^{13}\text{C}$ -NMR-DEPT-Spektren von **10** und P[DMAA-AZAA-NAS] **8**. A: **10**,  $^{13}\text{C}$ -NMR; B: **10**,  $^{13}\text{C}$ -NMR-DEPT; C: P[DMAA-AZAA-NAS] **8**,  $^{13}\text{C}$ -NMR; D: P[DMAA-AZAA-NAS] **8**,  $^{13}\text{C}$ -NMR-DEPT.

## Nachweis durch Umsetzung mit $N_\alpha$ -Fmoc-L-Lysin

Eine indirekte Möglichkeit zum Nachweis des eingebauten Aktivesterbausteines **10** ist es, den Umsatz der NAS-Seitengruppe mit Aminobausteinen zu beobachten. Für diesen Versuch wurden **P[DMAA-AZAA-NAS]** Polymere mit Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschütztem Lysin umgesetzt. Anschließend wurde die Fmoc-Gruppe abgespalten und die Abspaltung hinsichtlich des frei werdenden 9-Methylenfluorens photometrisch analysiert.



Schema 5-6: Reaktionsschema zur Quantifizierung des NAS-Anteils im Copolymer durch Umsetzung von **P[DMAA-AZAA-NAS]** mit Fmoc-Lys-OH und anschließender Abspaltung des 9-Methylene-fluorens zur photometrischen Bestimmung.

Die Polymere wurden in einen Gemisch aus Borax-Puffer (pH 9) und THF (3:1) gelöst (10 mg/mL) und mit 5 eq.  $N_\alpha$ -Fmoc-L-lysin pro berechnete NHS-Gruppe versetzt. Nach 16 h bei Raumtemperatur wurden die Polymere gegen Wasser dialysiert (MWCO 3500) und anschließend lyophilisiert. Vom Rückstand wurden je 10 mg entnommen, in DMF gelöst und mit Piperidin versetzt, sodass sich Endverhältnis von 7:3 (DMF:Piperidin) ergab. Nach 3 h wurden Absorptionsspektren von den Proben und dem Ausgangspolymeren aufgenommen. Das bei der Fmoc-Spaltung entstehende 9-Methylen-

fluoren erzeugt eine charakteristische Bande bei 301 nm. Die Differenz der Absorption bei 301 nm ist proportional zu dem Gehalt an 9-Methylen-fluoren in der Lösung, somit proportional zum Gehalt an NHS-Ester im Ausgangspolymer. Mithilfe des Extinktionskoeffizienten von 9-Methylen-fluoren ( $\epsilon_{301} = 7800 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ; (142)) kann dessen Gehalt bestimmt werden.

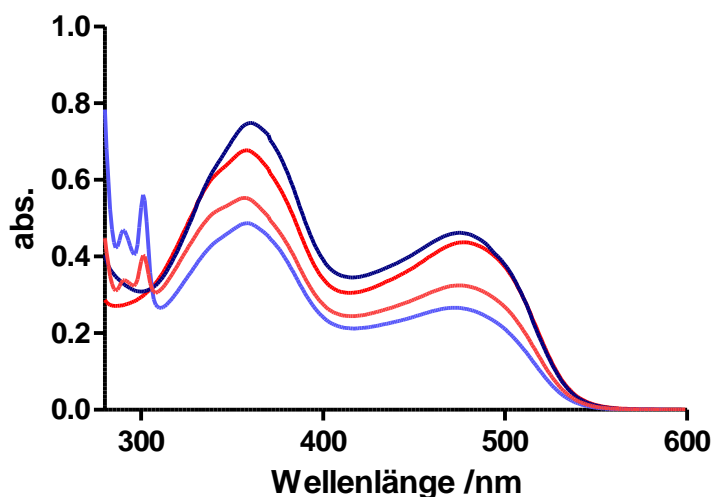


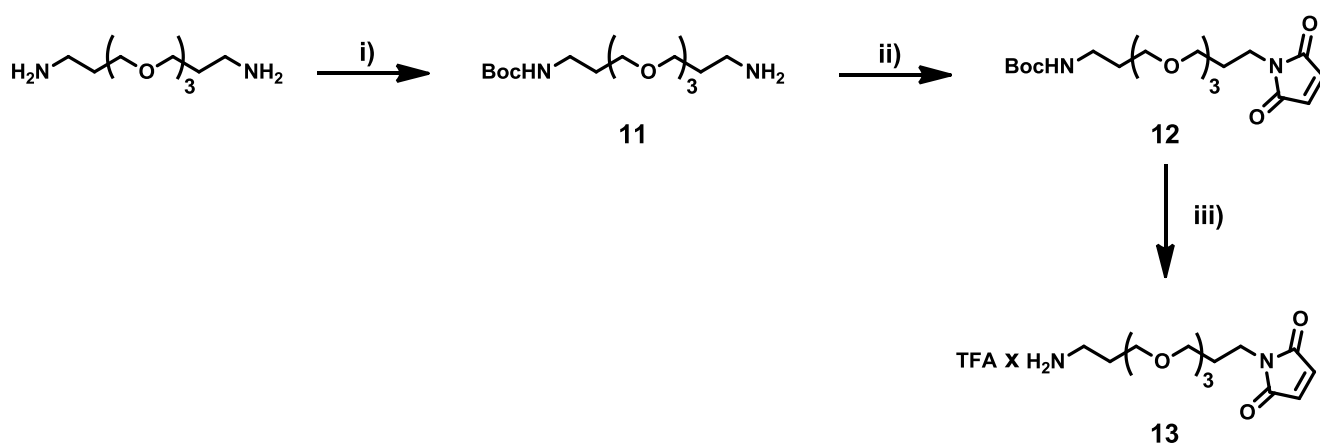
Abbildung 5-5: Absorptionsspektren der P[DMAA-AZAA-NAS] Polymere 5 und 8 vor der Umsetzung mit Fmoc-Lys-OH und danach, mit anschließender Fmoc-Abspaltung. Rot: P[DMAA-AZAA-NAS] 5; hellrot: P[DMAA-AZAA-NAS] 5 nach der Fmoc-Abspaltung; blau: P[DMAA-AZAA-NAS] 8; hellblau: P[DMAA-AZAA-NAS] 8 nach der Fmoc-Abspaltung. Die Peaks bei 301 nm sind proportional zum entstandenen 9-Methylen-fluoren.

Das entstandene 9-Methylen-fluoren konnte in beiden Proben nachgewiesen werden. Für P[DMAA-AZAA-NAS] 5 wurde ein NAS-Anteil von 3.4 % statt 3.0 % bestimmt und für P[DMAA-AZAA-NAS] 8 ein Anteil von 9.4 % statt 10.0 %. Die bestimmten Werte entsprechen weitestgehend den erwarteten.

Der indirekte Nachweis des NAS-Bausteins ist mit dieser Methode somit möglich. Ebenfalls ist hiermit eine Quantifizierung des eingebauten Bausteines realisierbar. Jedoch ist dieses Verfahren sehr aufwendig und nimmt einige Zeit in Anspruch. Für eine exaktere Bestimmung ist zudem eine Mehrfachbestimmung nötig. An dieser Stelle wurde aber darauf verzichtet, da der Nachweis des nahezu quantitativen Einbaus ausreicht, um den Einbau der Maleimidgruppe anzustreben. Die finale Polymerzusammensetzung kann nach der letzten Umsetzung, zum maleimidhaltigen Polymer, bestimmt werden.

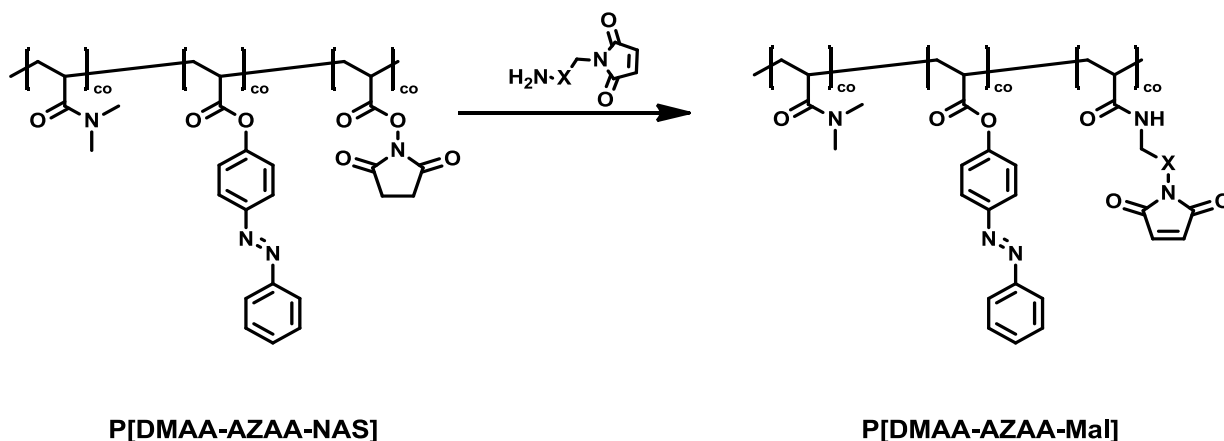
#### 5.2.1.4 Umsetzung mit Aminoalkylmaleimiden

An den Aktivesterpolymeren soll durch polymeranaloge Umsetzung eine Maleimidgruppe eingebaut werden. Dafür stehen verschiedene Maleimidderivate zur Verfügung. Entweder sind diese kommerziell erhältlich, wie Aminoethylmaleimid Hydrochlorid **AEMal**, oder sie müssen synthetisiert werden. Die Synthese von Aminoethylmaleimid **4c** (**AHMal**) wurde bereits in Kapitel 5.1.2 besprochen. 1-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (**13**, **APEGMal**) ist ein ähnliches Derivat. Es zeichnet sich durch einen pegylierten Linker aus, dieser ist im Gegensatz zu dem Hexyllinker besonders hydrophil und soll die Bindung an das Protein erleichtern.



Schema 5-7: Synthese von 1-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (**13**, **APEGMal**). i)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , DCM, 57 %; ii) *N*-Methoxycarbonylmaleimid; sat.  $\text{NaHCO}_3$ , 97 %; iii) DCM:TFA (3:1), 98 %.

Zur Darstellung des Maleimidbausteines wurde ein Überschuss des pegylierten Diamins mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  umgesetzt, das Reaktionsgemisch wurde anschließend durch Extraktion gereinigt. Das doppelt geschützte Nebenprodukt war im Produktgemisch zu ca. 33 % (Mol-%) enthalten und wurde nicht entfernt. Die Einführung der Maleimidgruppe erfolgte mit *N*-Methoxycarbonylmaleimid in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung in sehr guter Ausbeute. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung und Entschützung des Amins wurde das Produkt **13** als Öl erhalten.



Schema 5-8: Umsetzung von **P[DMAA-AZAA-NAS]** Copolymeren mit Aminoalkylmaleimiden. **AEMal**:  $X=CH_2$ ; **AHMal**:  $X=(CH_2)_5$ ; **APEGMal**:  $X=(CH_2)_3-(OCH_2CH_2)_3$ .

Um proteinreaktive Polymere zu erhalten, sollten die Aktivesterpolymere mit den Aminoalkylmaleimidbausteinen **AEMal**, **4c** und **13** umgesetzt werden (Schema 5-8). Zuerst wurden mit dem kommerziell erhältlichen Aminoethylmaleimid verschiedene Reaktionsbedingungen getestet. Hierbei wurde das Lösungsmittelsystem variiert: Borax-Puffer:THF, sowie DMF oder THF mit Diisopropylamin als Base. Außerdem wurden verschiedene Reaktionszeiten, Temperaturen und verschiedene Äquivalente des Aminobausteines und diverse Aufreinigungsmethoden getestet. Jedoch konnte wider Erwarten nie der Einbau des Bausteines in das Polymer im  $^1H$ -NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Erst die Verwendung der dargestellten Aminobausteine **4c** und **13**, mit den längeren Alkyllinkern, führte zum erfolgreichen Einbau.

Der Einbau der Maleimidbausteine konnte erfolgreich über  $^1H$ -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Der Anteil der Maleimidgruppe wurde durch das charakteristische und breite Singulett ( $\delta$ , Abbildung 5-6) bei ca. 6.7 ppm bestimmt. Des Weiteren konnten Signale den Linkern der Bausteine zugeordnet werden; dieses zeigte ebenfalls den Einbau an. Der Einbau erfolgte quantitativ, die gefundene Polymerzusammensetzung wich nur begrenzt von der berechneten Zusammensetzung ab. Die Polymere wurden anschließend hinsichtlich ihrer Trübungstemperatur charakterisiert und an Proteine konjugiert (5.5.2.2 Konjugation von Maleimidpolymeren an HDAH).

Tabelle 5-2: Berechnete und gefundene Zusammensetzung der Maleimid enthaltenen Polymere **P[DMAA-AZAA-Mal]** 1 – 4 nach der Umsetzung von **P[DMAA-AZAA-NAS]** 18 und 20 mit **AHMal** 4c oder **APEG-Mal** 13.

Nr.:	Edukt	DMAA			AZAA			APEG-Mal		AHMal		Aus- beute
		ber.:	gef.: <sup>a</sup>	gef.: <sup>b</sup>	ber.:	gef.: <sup>a</sup>	gef.: <sup>b</sup>	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	
in %												
1	18	80.0	80.2	85.0	10.0	9.8	8.0	10.0	7.0	-	-	79
2	18	80.0	80.2	79.2	10.0	9.8	7.3	-	-	10.0	13.5	60
3	20	86.0	87.3	85.4	12.0	12.7	11.3	-	-	2.0	3.3	71
4	20	86.0	87.3	85.0	12.0	12.7	12.5	2.0	2.5	-	-	53

a: Anteil nach der Polymerisation, b: Anteil nach der Umsetzung mit dem Aminobaustein

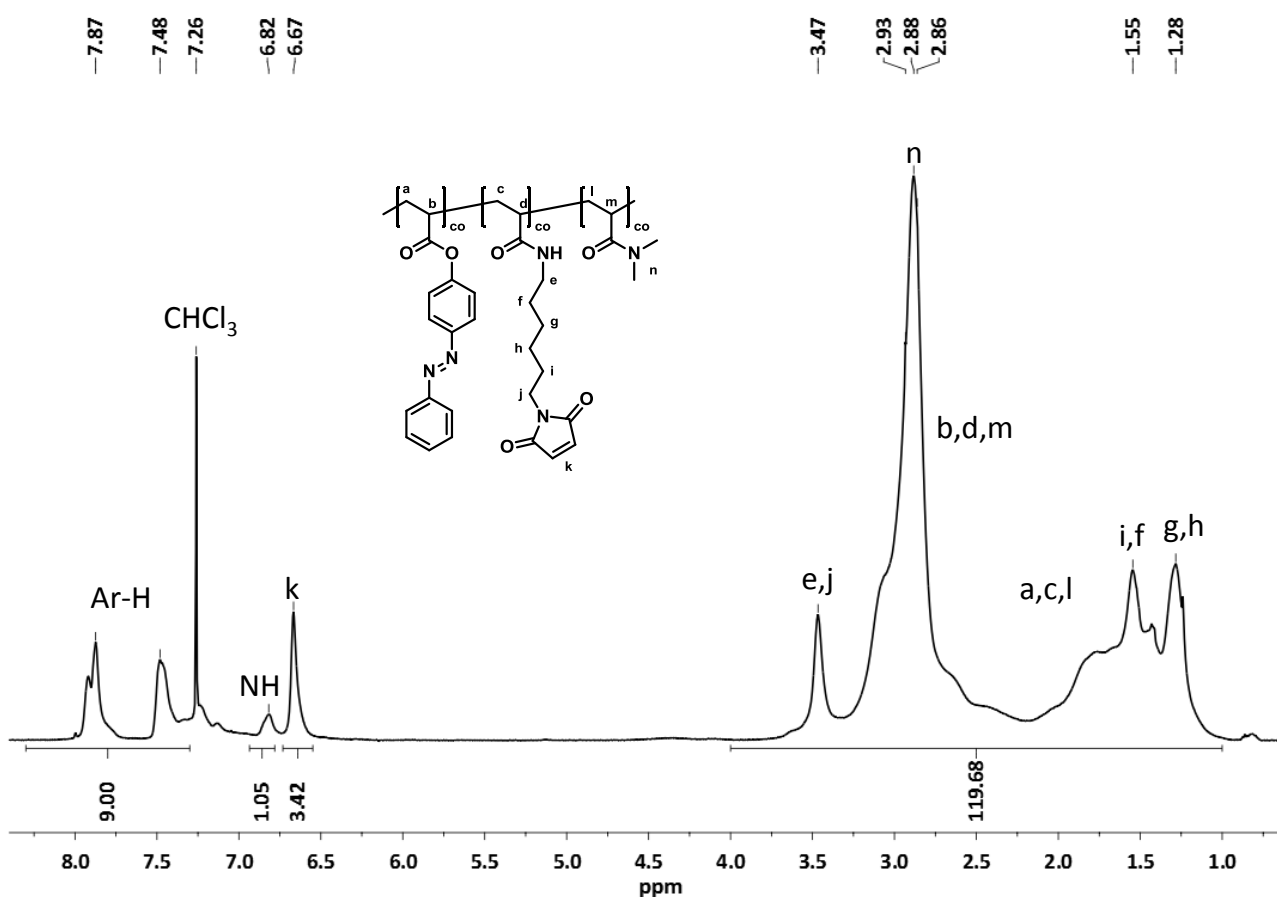


Abbildung 5-6: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Maleimidpolymers **P[DMAA-AZAA-Mal]** 2 in CDCl<sub>3</sub>. Aus dem Verhältnis der Integrale der aromatischen Protonen (Ar-H), der Maleimidprotonen (k) und den aliphatischen Proton zwischen 4.00 ppm und 1.00 ppm konnte die Zusammensetzung des Polymers bestimmt werden.



## 5.2.2 Polypentafluorophenylacrylat und polymeranaloge Umsetzung

Die Darstellung von Polymeren mit proteinreaktiven Seitengruppen bedarf häufig Postpolymerisationsreaktionen. Um eine Serie an Polymeren zu generieren, wird für jedes Polymer eine Polymerisation benötigt. Die dabei entstehende Molmassenverteilung hat ein Einfluss auf das Verhalten der Polymere. Die Verwendung von Aktivesterpolymeren und die Umsetzung an diesen vermeidet dieses Problem. Der am häufigsten verwendete Aktivestermonomerbaustein *N*-Acryloxysuccinimid (**10**) wird selten zur Synthese von Homoaktivesterpolymeren eingesetzt. Perfluorphenylacrylat **PFPA** ist ein aktivierter Acrylatbaustein, ein daraus hergestelltes Polymer (**PPFPA**) ist ebenfalls reaktiv gegenüber Aminen. Durch die Verwendung dieses Aktivesterpolymers, und die anschließenden Reaktionen daran, lassen sich diverse Polyacrylamide mit ähnlichen Polymerisierungsgraden und Molmassenverteilungen herstellen.

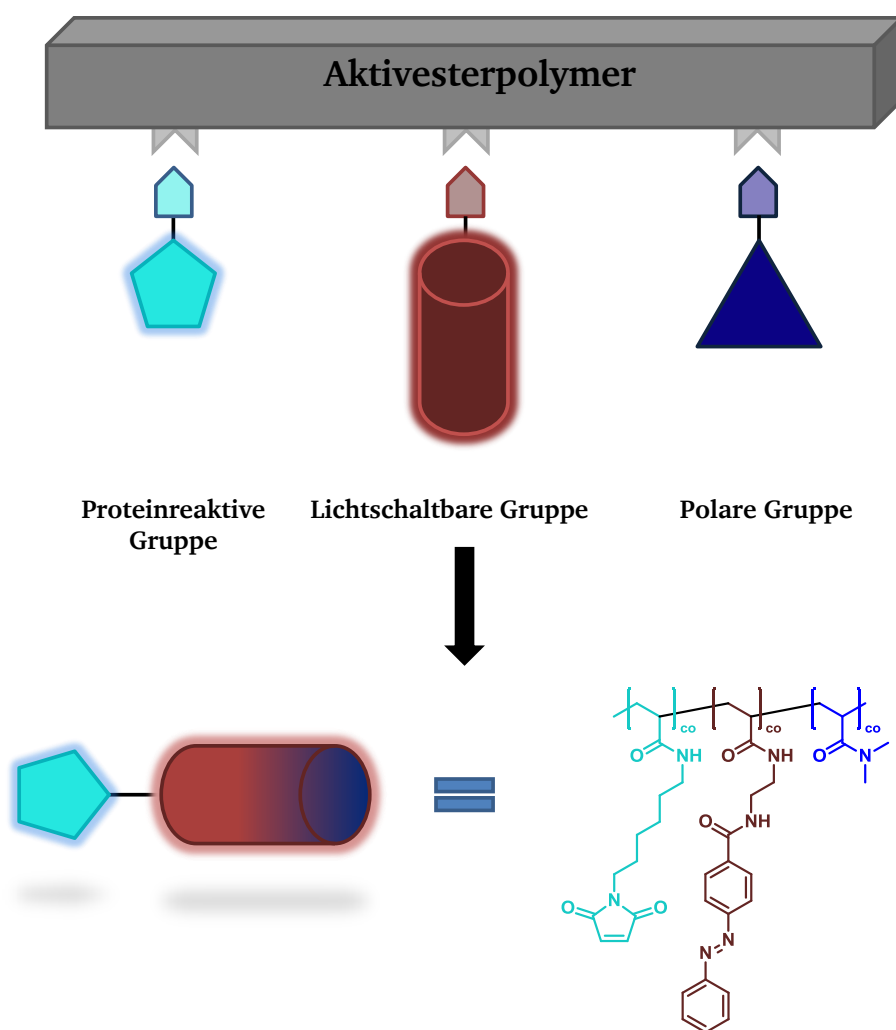
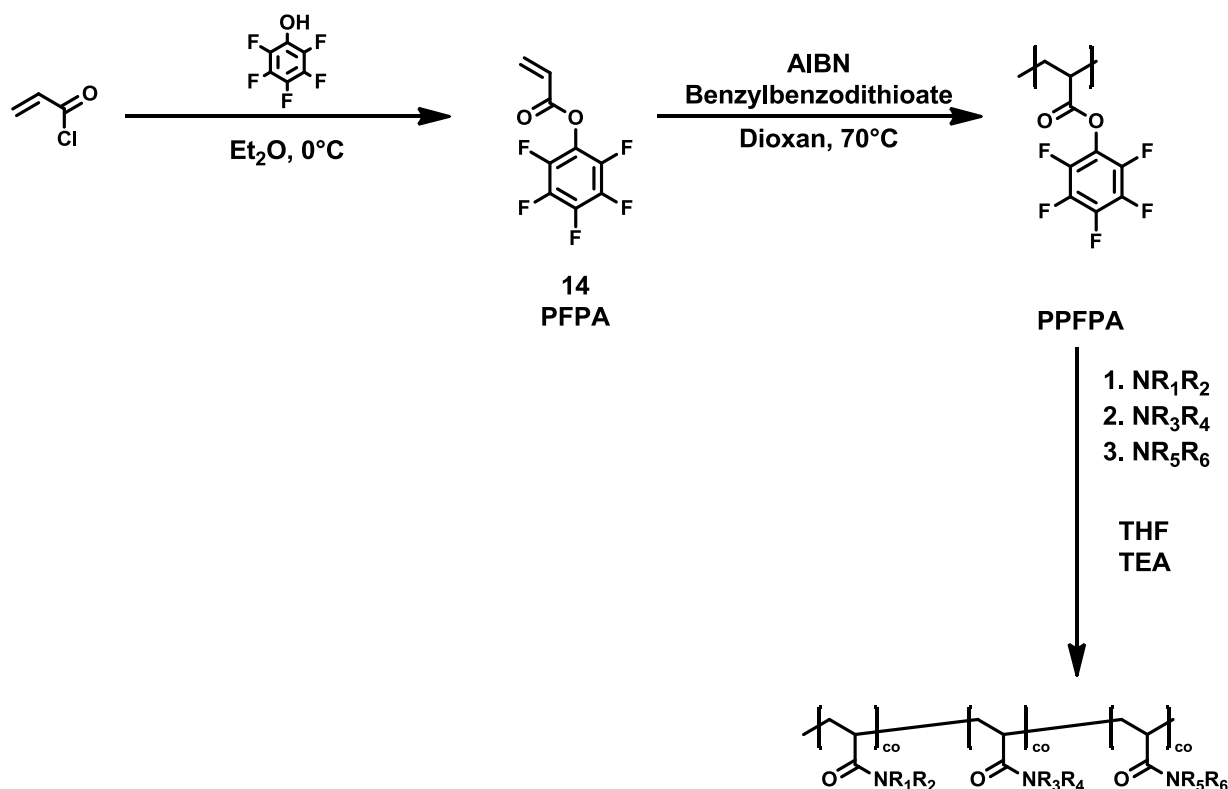


Abbildung 5-7. Schematische Darstellung zu Synthese der proteinreaktiven Polymeren mit lichtschaltbaren Gruppen durch Umsetzung verschiedener Bausteine an ein Aktivesterpolymer.



Schema 5-9: Synthese von Polyacrylamidcopolymeren. Acryloylchlorid wird mit Pentafluorphenol zum Aktivestermonomerbaustein verestert und anschließend in einer RAFT-Polymerisation zum Aktivesterpolymer umgesetzt. Die finale Umsetzung des Aktivesterpolymer **PPFPA** mit primären oder sekundären Aminen führt zu diversen Acrylamidcopolymeren.

Verschiedene Bausteine sind für diese Umsetzung denkbar (Abbildung 5-8): Alkylamine, wie Isopropylamin (IPA) oder Dimethylamin (DMA), die dazu beitragen, dass die Polymere wasserlöslich bzw. temperaturschaltbar werden; unpolare Gruppen, insbesondere (*E*)-*N*-(2-Aminoethyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide (**15**, **AZEA**), führen zu einem hydrophoberen Polymer mit einer lichtschaltbaren Gruppen. Des Weiteren ist der Einbau anderer Gruppen mit ausgesuchten Funktionalitäten möglich. Für Biokonjugationen sind insbesondere Bausteine mit proteinreaktiven Gruppen – wie Maleimide – interessant. Proteinspezifische Liganden, wie Aminoalkylderivate mit Inhibitorstrukturen z.B. *N*<sup>1</sup>-(4-((6-Aminohexyl)carbamoyl)phenyl)-*N*<sup>8</sup>-hydroxyoctanediamide (**AHSAHA**) oder Nitrilotriessigsäurederivate, sind ebenfalls denkbar. Sie führen zu Polymeren mit einer hohen Affinität zu bestimmten Proteinen.

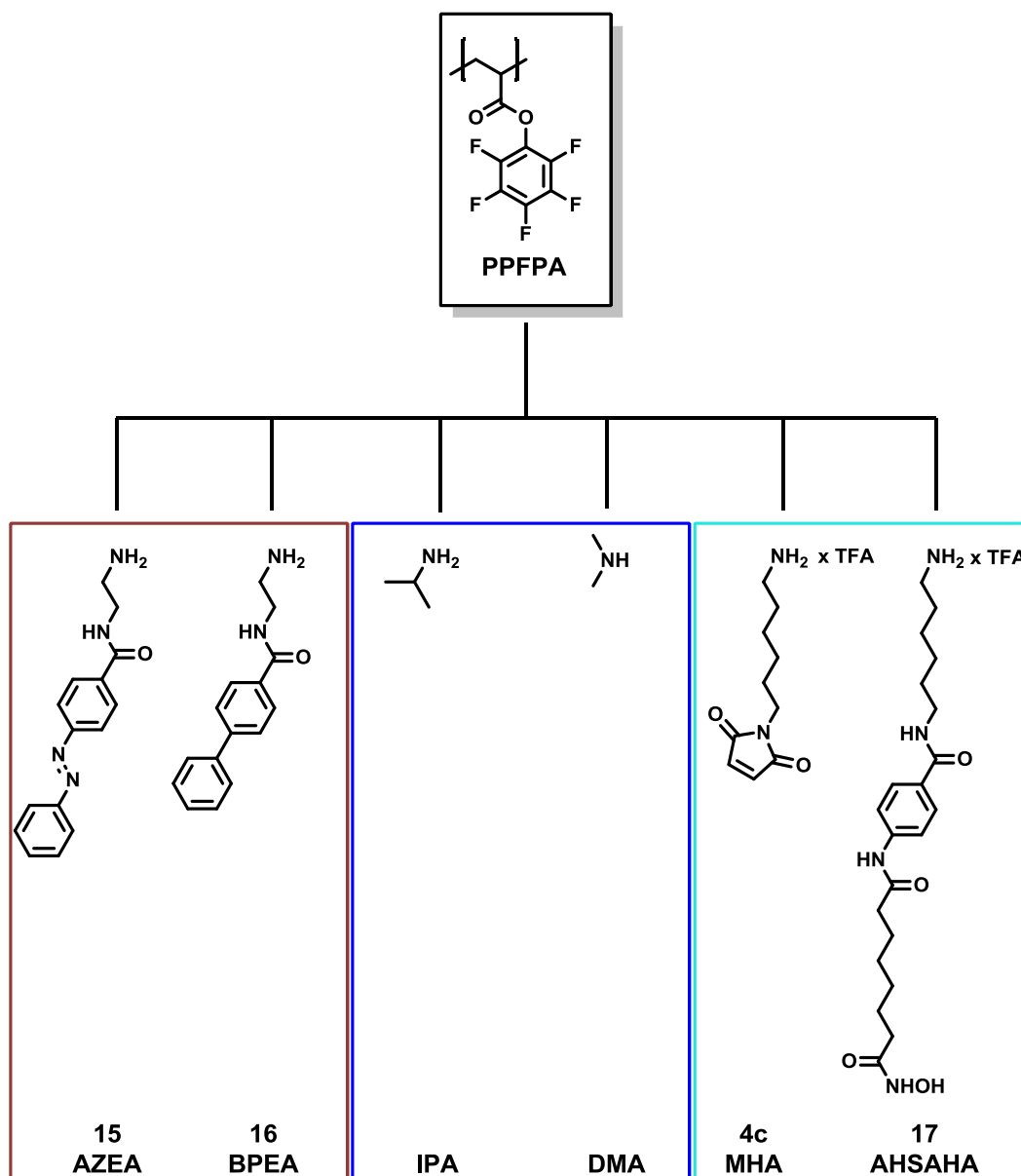


Abbildung 5-8: **PPFPA** und mögliche Aminobausteine zur polymeranalogen Umsetzung, sortiert nach ihren Eigenschaften. Rote Umrandung: lichtsichtbare und hydrophobe Bausteine; dunkelblaue Umrandung: hydrophile Bausteine mit temperatur-schaltbaren Eigenschaften; hellblaue Umrandung: Bausteine zur Bindung an Proteine.

### 5.2.2.1 Synthese des Aktivesterpolymers

Für die Darstellung des Polypentafluorphenylacrylats wird das entsprechende Monomer benötigt. Pentafluorphenylacrylat **14** konnte durch Umsetzung von Acryloylchlorid mit Pentafluorphenol mit Ausbeuten um die 65 % hergestellt werden. Das farblose Öl wurde anschließend in einer RAFT-Polymerisation in Dioxan mit Benzylthiobenzoat und Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) als Radikalstarter umgesetzt. Nach dem Fällern des Polymers in Hexan und anschließenden Trocknen wurde ein rosafarbener Feststoff erhalten. Die verschiedenen Chargen der Polymere wiesen ähnliche Molmassen

und Polydispersitäten auf. Der Polymerisierungsgrad lag bei ca. 36. Die Molmassen wurden gegen Polystyrolstandards bestimmt. Eine Bestimmung gegen einen PMMA-Standard in DMF als Eluent war nicht möglich. Außerdem wurden die Polymere mit  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR charakterisiert.

Tabelle 5-3: Dargestellte Polypentafluorphenylacrylat (**PPFPA**) Polymere.

PPFPA	Ausbeute / %	$M_n$ / kDa <sup>a</sup>	$M_w/M_n$
1	56	8.5	2.5
2	42	8.5	2.0
3	44	8.5	2.2

a: bestimmt durch Methode B

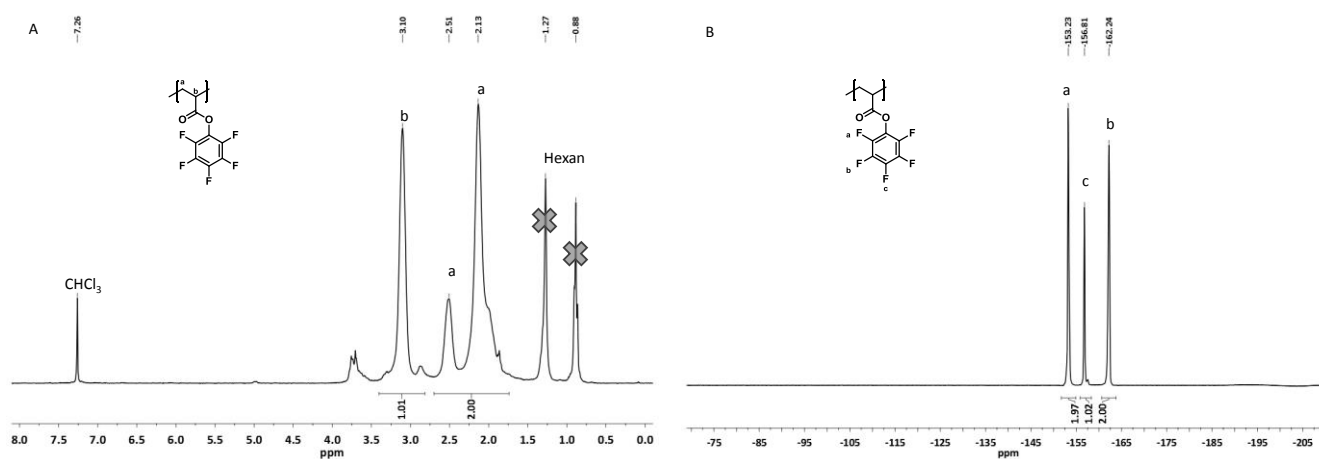
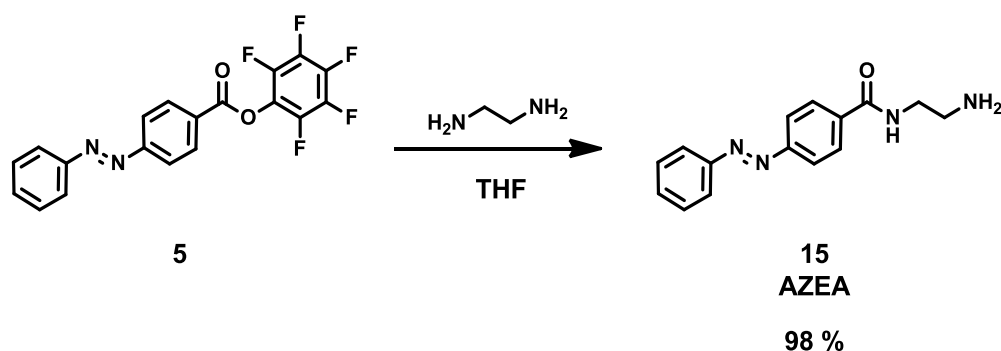


Abbildung 5-9: NMR-Spektren von Polypentafluorphenylacrylat (**PPFPA 1**). A:  $^1\text{H}$ -NMR, B:  $^{19}\text{F}$ -NMR.

Zur Darstellung von verschiedenen Copolymeren wurden diese Aktivester mit verschiedenen Aminobausteinen umgesetzt. Dafür wurde sie – soweit nicht anders beschrieben – in THF gelöst und mit den entsprechenden Aminobausteinen umgesetzt, als Base wurde TEA zugeben. Zum Absättigen überschüssiger Aktivestergruppen wurde anschließend Dimethylamin als 1 M Lösung in THF hinzugegeben. Zur Aufreinigung wurden sie in Diethylether gefällt und gegen Wasser dialysiert, siehe Polymeranaloge Umsetzungen.

### 5.2.2.2 Aminobausteine zur polymeranalogen Umsetzung an Polypentafluorphenylacrylat

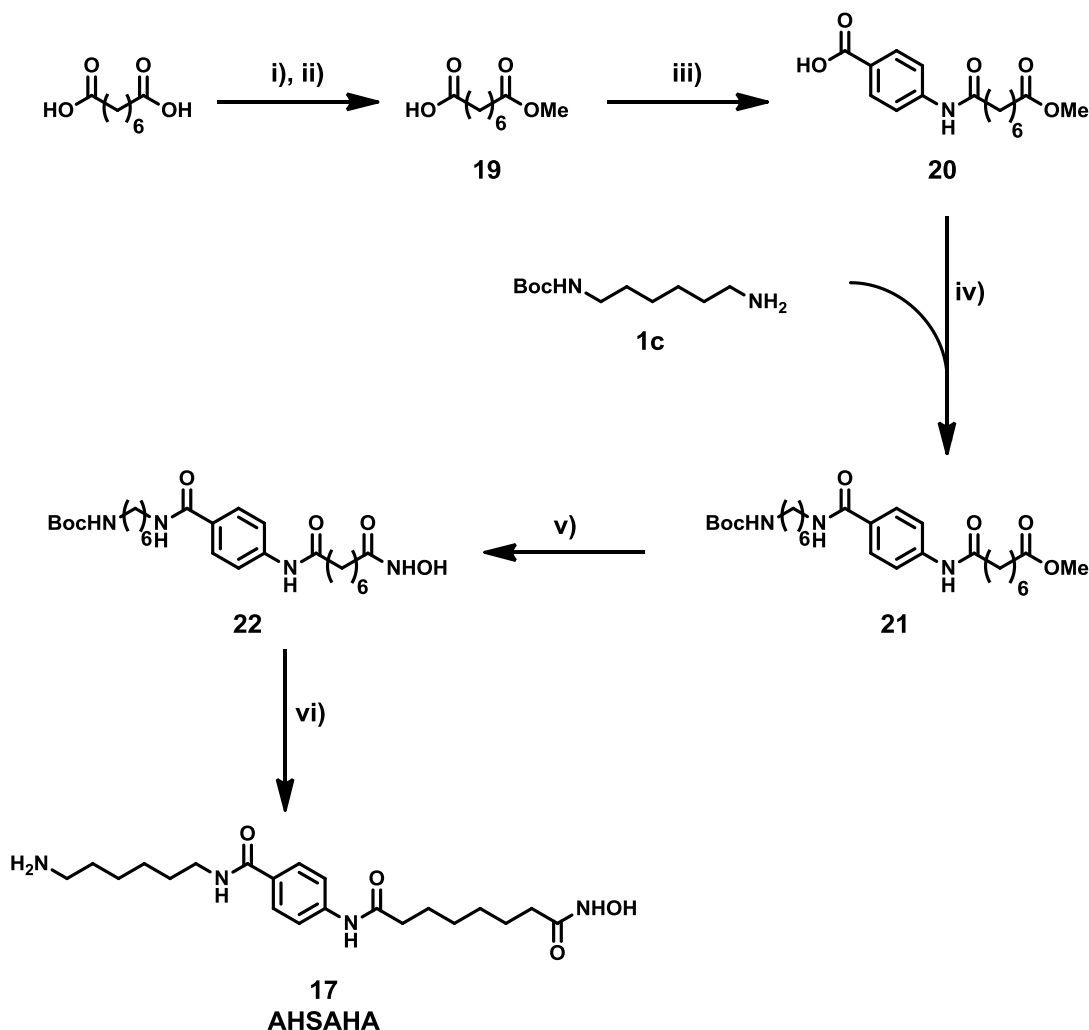
Aktivester reagieren unter basischen Bedingungen mit sekundären und primären Aminen unter Ausbildung einer Amidbindung. Zur Generierung von Polyacrylamid Copolymeren können verschiedenen Aminobausteine mit dem Aktivesterpolymer **PPFPA** umgesetzt werden. Diese Moleküle können kommerziell bezogen werden, wie Dimethylamin (DMA) oder Propan-2-amine (Isopropylamin, IPA), oder müssen dargestellt werden. Die Synthese von **4c (AHMal)** wurde bereits in Kapitel 5.1.1 beschrieben. *N*-(2-Aminoethyl)-4-(2-phenyldiazenyl)benzamide (**15, AZEA**) ist ein lichtsensitiver, unpolarer Baustein. Die Verwendung dieses Molekül soll den LCST-Wert erniedrigen und ein lichtschaltbares Polymer erzeugen. Durch Umsetzung von Ethylendiamin mit dem aktivierten Azobenzenbaustein **5** konnte **15 (AZEA)** in sehr guten Ausbeuten gewonnen werden, siehe Schema 5-10.



Schema 5-10: Darstellung des Aminoalkylazobenzenbausteins **15 (AZEA)**.

Der Vergleichsbaustein *N*-(2-Aminoethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamide (**16, BPEA**) wurde über das Säurechlorid von 4-Phenylbenzoesäure und dessen Amidierung mit Ethylendiamin dargestellt.

Um die Möglichkeit aufzuzeigen, Polymere für nichtkovalente Biokonjugationen ebenfalls über polymeranaloge Umsetzungen darzustellen, wurde das Derivat **17 (AHSAHA)** des bekannten Histone-Deacetylase-Inhibitors *N*-Hydroxy-*N*-phenyloctandiamid (SAHA) synthetisiert (Schema 5-11). Hierfür wurde Octandisäure selektiv geschützt und anschließend an 4-Aminobenzoesäure gebunden. An die generierte Vorstufe wurden das MonoBoc-geschützte Hexandiamin **1c** konjugiert. Anschließend wurde die Hydroxamsäure **22** aus dem Methylester **21** erzeugt und das Amin entschützt.



Schema 5-11: Darstellung von **17** (AHSAHA). (i) MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, reflux 16 h (81 %); (ii) **18**, KOH, MeOH, rt, 16 h (31 %); (iii) 1. Oxalylchlorid, DMF, THF, rt, 1.5 h; 2. Aminobenzoesäure, THF, TEA, rt, 16 h (51 %); (iv) **1c**, HOBt×H<sub>2</sub>O, EDC×HCl, TEA, DMF, rt, 16 h (57 %); (v) NH<sub>2</sub>OH×HCl, KOH, MeOH, rt, 3h, (50 %); (vi) TFA, DCM, 3 h, rt (quant).

Octandisäure wurde in MeOH mit konz. Schwefelsäure als Katalysator zum Diester **18** verestert. Mit einem Äquivalent KOH in Methanol wurde eine Methoxygruppe wieder abgespalten, sodass weitestgehend der Monomethylester **19** entstand. Die unerwünschten Nebenprodukte (Octandisäure und der Diester **18**) konnten durch sequentielle Extraktion mit unterschiedlichen Waschlösungen entfernt werden. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde der Monomethylester **19** selektiv mit Hexan herausgewaschen. Die erzielten Ausbeuten entsprachen der Literatur (143). Nachfolgend wurde die freie Carboxylgruppe des Monomethylesters **19** mit Oxalylchlorid und einer katalytischen Menge DMF in ein Säurechlorid übergeführt und anschließend mit der 4-Aminobenzoesäure umgesetzt. Die Zwischenstufe **20** konnte durch Umkristallisation mit einer Ausbeute von 81 % erhalten werden. Anschließend wurde das einfach geschützten Diamin **1c** an die Zwischenstufe **20** mittels den Kupplungsreagenzien EDC und HOBt gebunden. Die Hydroxamsäuregruppe wurde an der Carbonylgruppe des Methylesters **21** mit Hydroxylamin und einer geringen Menge Base in MeOH eingeführt. Abschließend

wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan die Boc-Schutzgruppe abgespalten. Man erhielt Amino-hexyl-suberoylanilidhydroxamsäure **17** (AHSAHA) als TFA-Salz in quantitativer Ausbeute und ohne weitere Aufreinigung. Dieser Baustein wurde hinsichtlich seiner inhibitorischen Fähigkeiten gegenüber den Hydrolasen HDAH und APAH charakterisiert. Dafür wurden Dosis-Wirkungskurven des Liganden aufgenommen und die mittlere inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  bestimmt (Tabelle 5-4). Die Ergebnisse korrelierten mit dem Modellmolekül SAHA, sodass eine ähnlich hohe Affinität zu HDAH bestand.

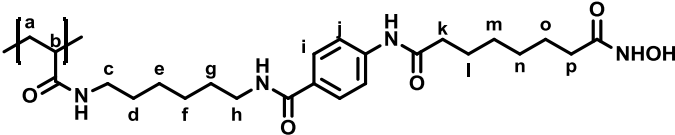
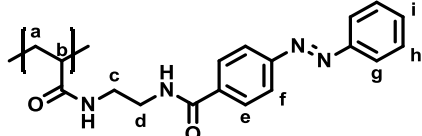
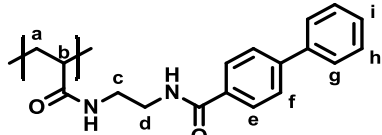
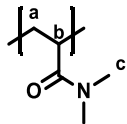
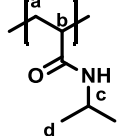
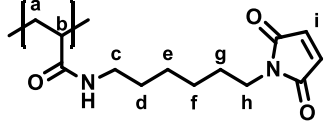
Tabelle 5-4:  $IC_{50}$ -Werte der Liganden von HDAH und APAH mit Standardabweichung (n=3)

	HDAH	APAH
	$IC_{50}/nM$	
AHSAHA	$27 \pm 1.0$	$7 \pm 0.4$
SAHA*	$16 \pm 0.9$	$5 \pm 0.4$

\*= als Referenz

Nach der Umsetzung des Aktivesterpolymers **PPFPA** mit den Aminobausteinen muss der Einbau quantifiziert werden. Die Zusammensetzung der finalen Polymere, wie auch ihre Zwischenstufen, lässt sich durch  $^1H$ -NMR-Spektroskopie bestimmen. Hierfür wurden die charakteristischen Signale im Spektrum integriert und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die nachfolgende Tabelle 5-5 zeigt die möglichen Seitengruppenbausteine mit der Zuordnung der Protonen zu dem Bereich der chemischen Verschiebung. Die Verschiebung wurde in vier Bereiche unterteilt: Im ersten Bereich von 8.3 ppm bis 7.3 ppm findet man die Signale für die aromatischen Gruppen, zwischen 6.8 ppm und 6.6 ppm erwartet man das Singulett der Maleimidgruppe und zwischen 4.2 ppm und 3.8 ppm ein breites Signal für die Methingruppe des Isopropylacrylamids. Zwischen 3.8 ppm und 1.0 ppm findet man die übrigen Signale. Unter anderem die Protonen des Polymerrückgrates, die Methylprotonen des Dimethylacrylamids oder die Protonen von aliphatischen Linkern. Mithilfe dieser Bereiche lassen sich die Anteile der Bausteine differenzieren und die Polymerzusammensetzung berechnen. Nicht betrachtet bei der Berechnung der Zusammensetzung wurden austauschbare Protonen, wie z.B. amidische Protonen, sowie die Polymerendgruppen der RAFT-Polymerisation. Außerdem wurden die Endgruppen nicht zur Berechnung der Molmasse verwendet, da sie sowohl aus dem Fragment des RAFT Reagenz als auch aus dem Fragment des Radikalstarters bestehen können, und somit eine absolute Molmassenbestimmung damit nicht möglich ist.

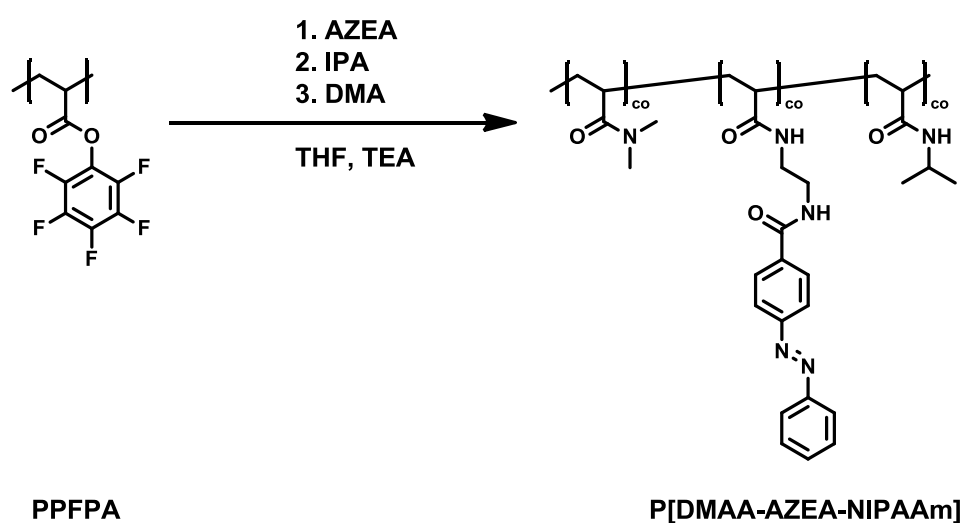
Tabelle 5-5: Mögliche Polyacrylamidseitengruppen nach der polymeranalogen Umsetzung der Aminobausteine mit **PPFPA**. Die Protonen der Polymergruppen sind hinsichtlich ihrer Verschiebung verschiedenen Bereichen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zugeordnet, um eine Bestimmung der Polymerzusammensetzung zu ermöglichen.

Polyacrylamidseitengruppen der verwendeten Aminobausteine		Bereich des $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums			
		$\delta$ / ppm			
		8.3–7.3	6.8–6.6	4.2– 3.8	3.8–1.0
AHSAHA		i, j 4H	-	-	a-h, k-p 27H
AZEA		e-f 9H	-	-	a-d 7H
BPEA		e-i 9H	-	-	a-d 7H
DMAA		-	-	-	a-c 9H
IPA		-	-	c 1H	a-b,d 9H
AHMal		-	i 2H	-	a-h 15H



### 5.2.2.3 P[DMAA-AZEA-NIPAAm] Copolymere

Dimethylacrylat Copolymere zeigen in Gegenwart von unpolaren Copolymerbausteinen ein LCST-Verhalten, jedoch ist dieser sehr stark von der Polymerzusammensetzung abhängig. Ist der Anteil der unpolaren Gruppe – hier AZEA – zu hoch, lässt sich das Polymer nicht mehr in Wasser lösen. Ist er zu gering, ist das Polymer in dem typischen Temperaturbereich (bis 100 °C) nicht schaltbar. Um diesen Effekt zu minimieren und den Einfluss der verschiedenen Seitengruppen auf den Trübungspunkt besser verstehen zu können, wurden Copolymere mit *N*-Isopropylacrylamid Gruppen, neben den Seitengruppen des DMAA und des AZEA, dargestellt (siehe Schema 5-12).



Schema 5-12: Darstellung der P[DMAA-AZEA-NIPAAm] Copolymere durch Umsetzung des entsprechenden Aminobausteine mit PPFPA.

Die Polymere wurden, wie in Kapitel 7.5.3.2 Umsetzung an PPFPA 1 (Variante a) beschrieben, durch sukzessives zugeben der Aminokomponente in eine Lösung von PPFPA 1, dargestellt. Ihre Zusammensetzung (Tabelle 5-6) wurde durch Integration der charakteristischen Signale bestimmter Protonen der Seitengruppe im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 5-10) und das Verhältnis dieser Integrale untereinander bestimmt. Die gefundenen eingebauten Anteile entsprachen weitestgehend den berechneten. AZEA ließ sich tendenziell etwas schlechter einbauen, hier weicht der gefundene Wert ca. 2–3 % vom berechneten Wert ab. Isopropylamin reagierte besser mit dem Aktivester, der gefundene Wert für den eingebauten Anteil ist meist höher als der berechnete Wert.

Tabelle 5-6: Polymerzusammensetzungen der **P[DMAA-AZEA-NIPAAm]** Copolymere.

Nr.:	DMAA		AZEA		NIPAAm		Aus- beute <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> <sup>b</sup>  /kDa	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:			
	/%								
1	82.5	83.3	10.0	8.3	7.5	8.4	90	7.8	2.0
2	80.0	77.6	10.0	8.0	10.0	14.4	95	8.2	2.0
3	75.0	73.8	10.0	7.1	15.0	19.1	75	9.0	2.1
4	60.0	62.6	10.0	7.3	30.0	29.8	63	11.7	1.9
5	70.0	66.2	15.0	12.8	15.0	21.0	77	11.1	1.7
6	55.0	47.0	15.0	15.6	30.0	37.3	67	13.4	2.3
7	85.0	83.9	10.0	8.3	5.0	7.8	61	8.1	4.9
8	80.0	78.0	15.0	12.0	5.0	10.0	79	8.6	1.8

a: berechnet auf Basis der gefunden Zusammensetzung; b: bestimmt durch Methode A.

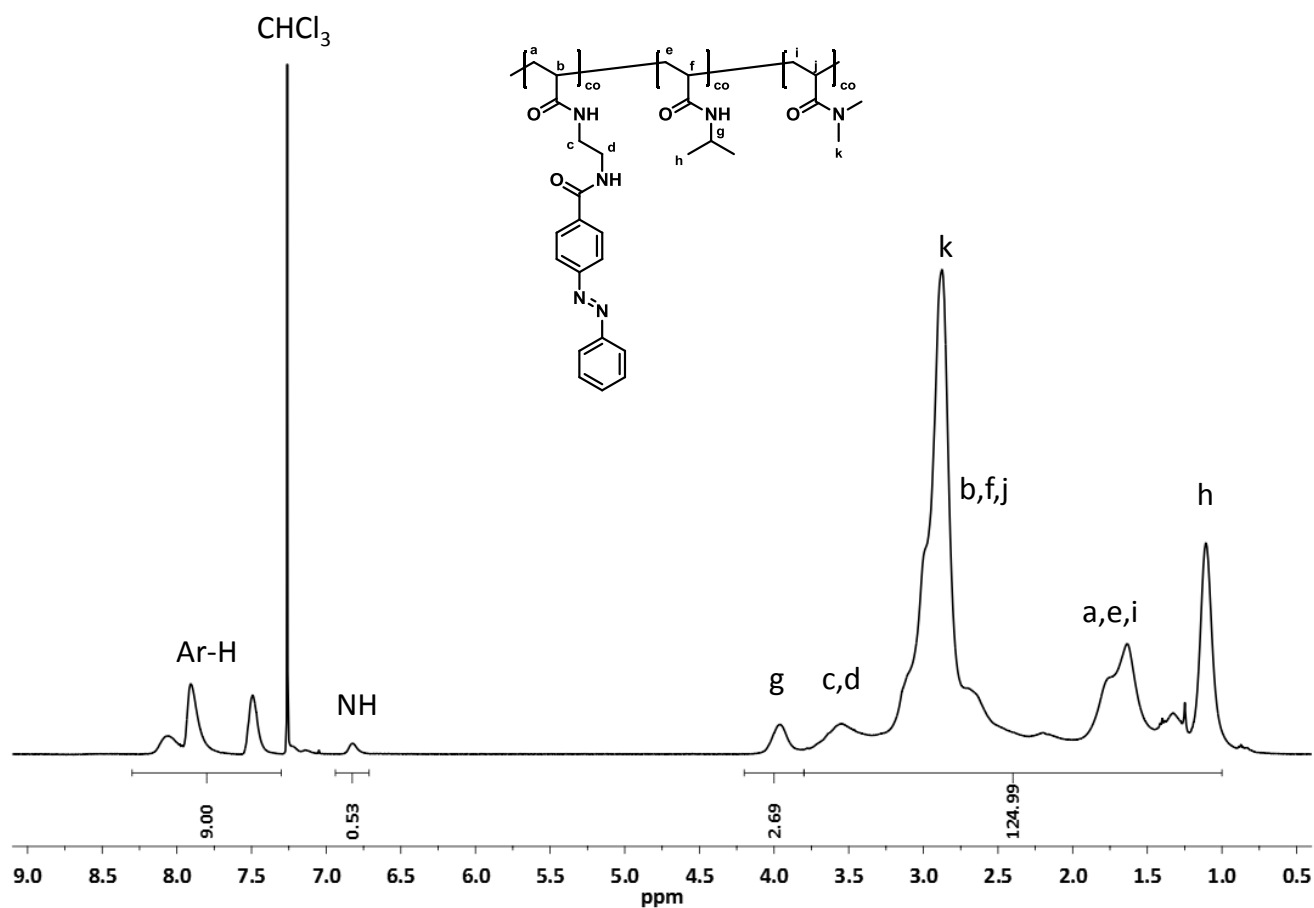


Abbildung 5-10: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **P[DMAA-AZEA-NIPAAm] 3** in CDCl<sub>3</sub>.

#### 5.2.2.4 Umsetzung mit Aminoethylmaleimid

Das Aktivesterpolymer Polypentafluorphenylacrylat **PPFPA** lässt sich mit verschiedenen Amino- bausteine umsetzen, somit ist es möglich eine Variation von Copolymeren zu bekommen. Wie bereits in Kap. 5.2.1.4 besprochen sind proteinreaktive Gruppen im Polymer ein Ziel. Der Einbau dieser Gruppen sollte analog zu den bisherigen polymeranalogen Umsetzungen erfolgen. Als Amino baustein wurde Aminoethylmaleimid **4c** verwendet. Dieser Baustein ermöglicht eine spätere Biokonjugation der Polymere an exponierte Cysteinseitengruppen eines Proteins. Des Weiteren ließ sich **4c** bereits in die **P[DMAA-AZAA-NAS]** Polymere einbauen. Die Synthese der maleimidenthaltenden Polymere wurde analog zu den Synthesen im vorherigen Kapiteln durchgeführt. Die verschiedenen Bausteine wurden zum **PPFPA** gegeben, nach der Reaktion wurde Dimethylamin zum Absättigen der Aktivestergruppen hinzugegeben und anschließend das Polymer aufgearbeitet. Der Maleimidbaustein konnte jedoch niemals nachgewiesen werden. Um einen erfolgreichen Einbau dennoch zu beobachten, wurde viel variiert: der Maleimidanteil wurde bis auf 20 % hochgesetzt, **AZEA** wurde nicht verwendet und die Aufreinigungsmethode wurde variiert. Allerdings führten diese Variationen ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis und das charakteristische Signal für das Maleimid im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum blieb aus.

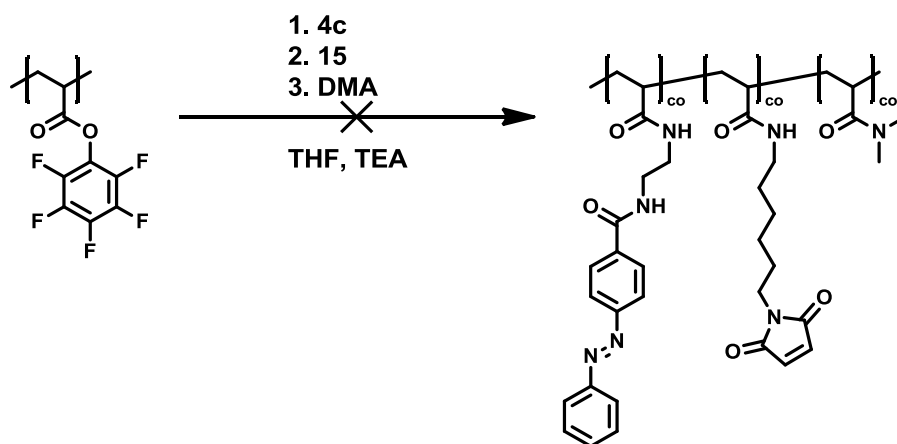
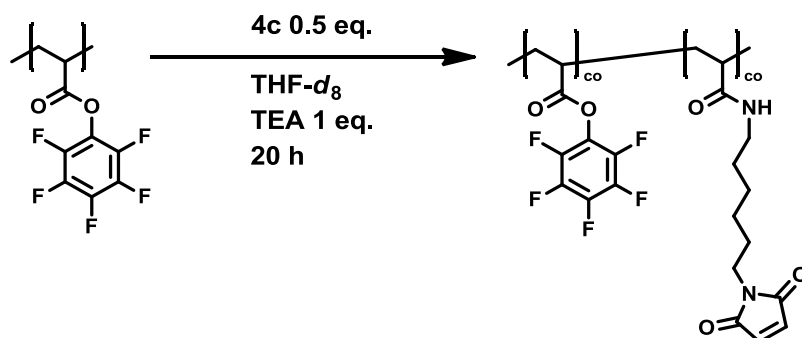


Abbildung 5-11: **PPFPA** und die nicht erfolgte Umsetzung mit dem Aminobausteinen **4c** (**AHMal**), **15** (**AZEA**) und Dimethylamin.

Da bisher dieser Baustein nicht eingebaut werden konnte, wurde zur Methodenentwicklung und zur Überprüfung der Einbaurate eine Reaktion im NMR-Röhrchen durchgeführt und ohne weitere Aufarbeitung charakterisiert. Dabei sollte der Umsatz durch Integration der einzelnen Signale sichtbar werden. **PPFPA 1** wurde mit 0.5 Äquivalenten **AHMal** pro Aktivestergruppe in deuteriertem Tetrahydrofuran umgesetzt und anschließend charakterisiert, siehe Polymeranaloge Umsetzungen **PPFPA 1** Variante b.



Schema 5-13: Umsetzung von **PPFPA** mit Aminohexylmaleimid **4c** als Testreaktion. Diese Reaktion wurde im analytischen Maßstab im NMR-Probenröhrchen durchgeführt.

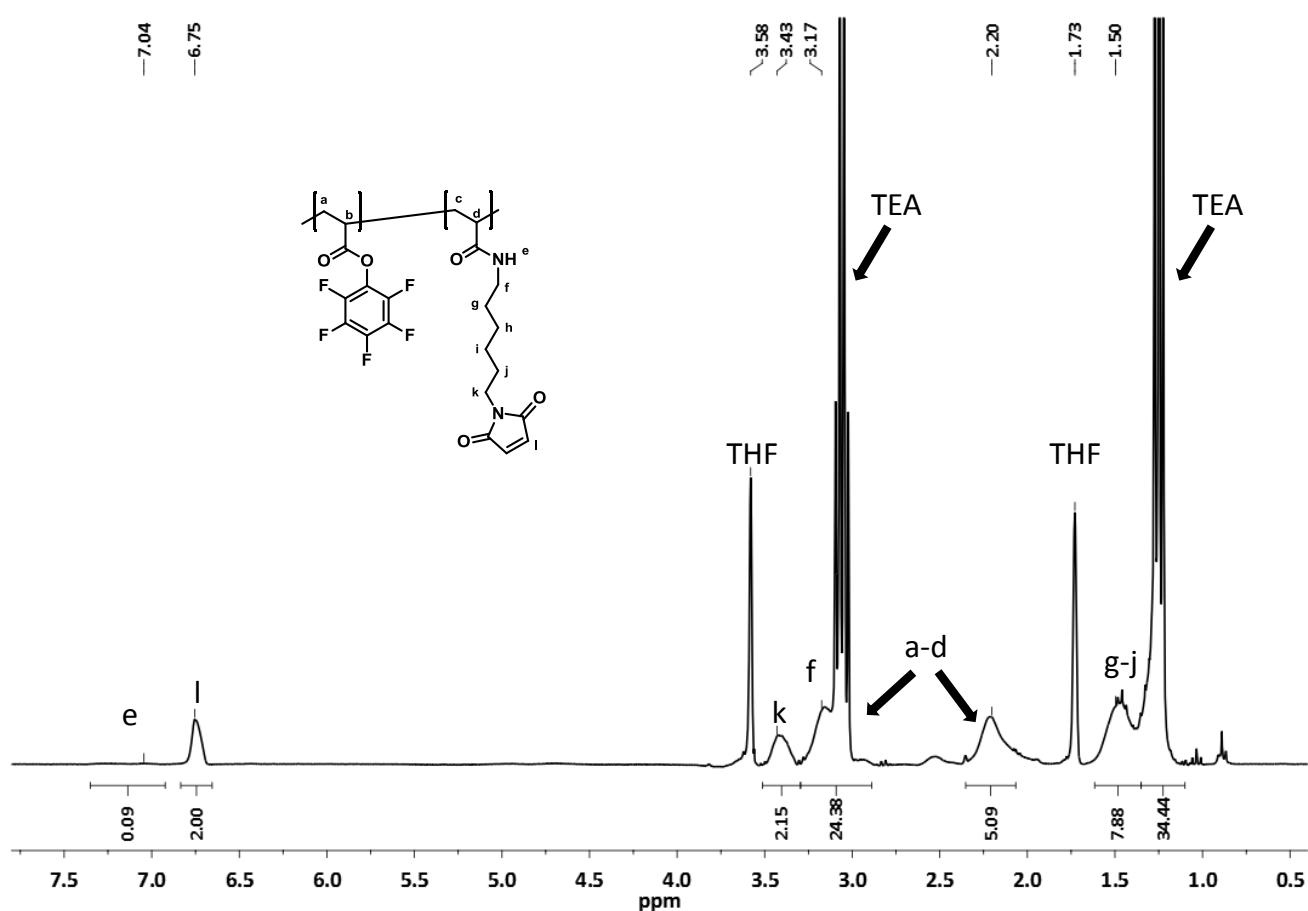


Abbildung 5-12:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Reaktionsgemisches von **PPFPA**, **4c** und TEA in  $\text{THF-}d_8$ . Der Einbau von **4c** ist durch die breiten Signale für die Protonen f, k und l zu erkennen.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 5-12) wies das charakteristische Signal der Maleimidgruppe bei ca. 6.7 ppm (l) auf, zudem ist es ein breites Signal, dieses deutete auf einen Einbau in die Polymerkette hin. Des Weiteren war das Signal für die Methylengruppe neben dem primären Amin (bei **4c** bei ca. 2.7 ppm) nicht mehr erkennbar, dafür erscheint ein Signal bei 3.2 ppm (f) und bei 3.43 ppm (k).

Dieses deutete auf eine vollständige Umsetzung zum Amid hin. Da die Reaktion nicht aufgearbeitet wurde, befand sich in der Reaktionslösung noch Triethylamin. Dieses generierte das Triplett und das Quartett bei 1.2 bzw. 3.0 ppm. Beide waren gegenüber dem Literaturwert von 0.97 und 2.46 ppm (144) leicht verschoben, da es hier als Salz mit der Trifluoressigsäure vorliegt. Die Trifluoressigsäure stammt von dem Maleimidbaustein **4c**, da dieser als Trifluoracetat vorlag.

Daneben erfolgte die Charakterisierung mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR (Abbildung 5-13). Hier erscheinen weniger Signale, dieses könnte eine zeitaufgelöste Auswertung erleichtern. Neben dem Signal für das sich noch im Reaktionsgemisch befindende TFA ( $-79\text{ ppm}$ ), sind die Signale für die Pentafluorphenylgruppe zuerkennen. Hierbei lässt sich zwischen denen des Polyacrylates (a – c) und den Signalen des freien Pentafluorphenols (d – f) unterscheiden. Eine Auswertung der Intergrale ermöglicht es, das Verhältnis zwischen umgesetzten und nicht umgesetzten Aktivester zu bestimmen. Hierbei liegt das Verhältnis bei 23 % zu 77 %, dieses entspricht einem Umsatz von 46 % nach 20 h. Es korreliert allerdings nicht mit den Ergebnissen aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Dort kann das Signal für die Methylen-Gruppe in Nachbarschaft zu der Aminogruppe nicht mehr detektiert werden, diese würde eine vollständige Umsetzung bedeuten.

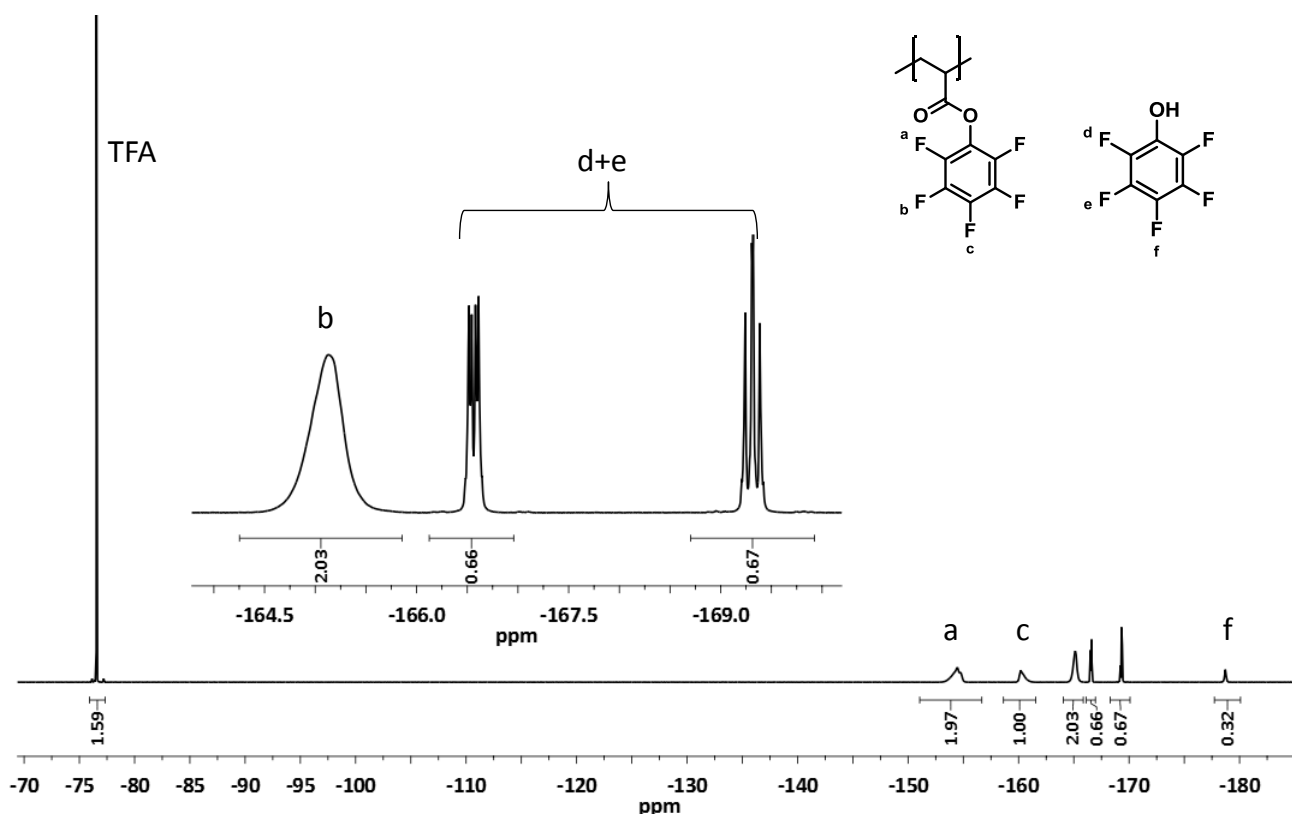


Abbildung 5-13:  $^{19}\text{F}$ -NMR -Spektrum des Reaktionsgemisches von **PPFP**, **4c** und TEA in THF. Erkennbar sind die Signale von Trifluoressigsäure (TFA) und die der Pentafluorphenylgruppe. Letztere erscheinen für das Polyacrylat (a – c) sowie für das freie Pentafluorphenol (d – f).

---

Die Bestimmungen der Einbaugeschwindigkeit und der Zeit bis zum maximalen Umsatz sollten zur Optimierung der Reaktionsbedingungen mittels NMR somit möglich sein. Um den Umsatz im – Zeitverlauf aufzunehmen, wurde der Versuch mit den gleichen Ansätzen wiederholt und alle 2 h je ein  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektrum aufgenommen. Gemessen wurde direkt nach der Zugabe der Reagenzien (2 min) und nach 2 h, 4 h und 6 h.

Schon kurz nach der Zugabe konnte Umsatz beobachtet werden. Das Signal der Maleimidgruppe bei 6.7 ppm wurde von einem scharfen zu einem breiten Singulett (siehe Abbildung 5-14). Dieses deutete auf den Einbau in das Polymer hin. Bei längerer Reaktionszeit konnte jedoch keine weitere Veränderung mehr festgestellt werden, das Gleiche gilt für den Bereich von 4.0 ppm bis 0.5 ppm (Abbildung 5-15). Das Ausgangsspektrum unterschied sich nicht von den nachfolgenden Spektren. Das Signal für die Methylengruppe neben dem primären Amin des Bausteines **4c** (bei ca. 2.7 ppm) konnte nicht detektiert werden. Dafür aber ein Signal bei 3.2 ppm, dieses deutet auf den Einbau des Bausteines **4c** in das Polymer und auf die Bildung des Amids hin. Außerdem konnten die Signale des Triethylamins wieder detektiert werden. Nach 2 min waren sie schon gegenüber dem Literaturwert verschoben (q 3.01 ppm, t 1.23 ppm), jedoch noch nicht vollständig. Den Endwert (q 3.05 ppm, t 1.25 ppm), wie in Abbildung 5-12, erreichten sie erst nach 2 h. Dieses deutete ebenfalls auf eine abgeschlossene Reaktion hin.

Die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren (Abbildung 5-16) zeigten die Signale der Ausgangssubstanz **PPFPA** und von Pentafluorphenol. Nach einer Reaktionsdauer von zwei Minuten konnte schon Umsatz beobachtet werden. Die nachfolgenden Spektren unterschieden sich vom Ausgangsspektrum kaum. Das Integrieren der Signale wies auf eine Zusammensetzung von 13 % zu 87 % (konjugiertes Polymer zu Ausgangssubstanz) hin, dies entspräche einem Umsatz von 26 %. Allerdings würde man beim  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von einem vollständigen Umsatz ausgehen.

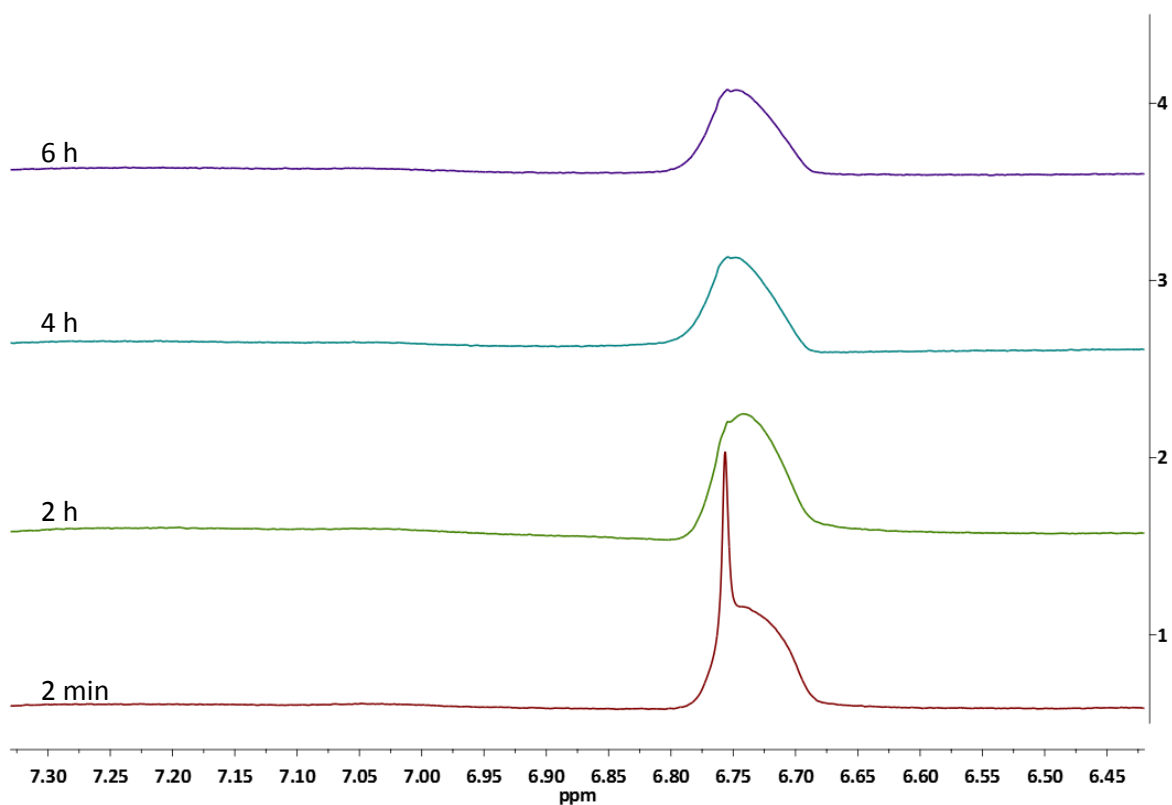


Abbildung 5-14:  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der Proben im Bereich der Protonen der Maleimidgruppe zwischen 7.4 ppm und 6.4 ppm. Die Spektren wurden nach 2 min, 2 h, 4 h und 6 h nach der Zugabe des **AHMal** Bausteines **4c** aufgenommen.

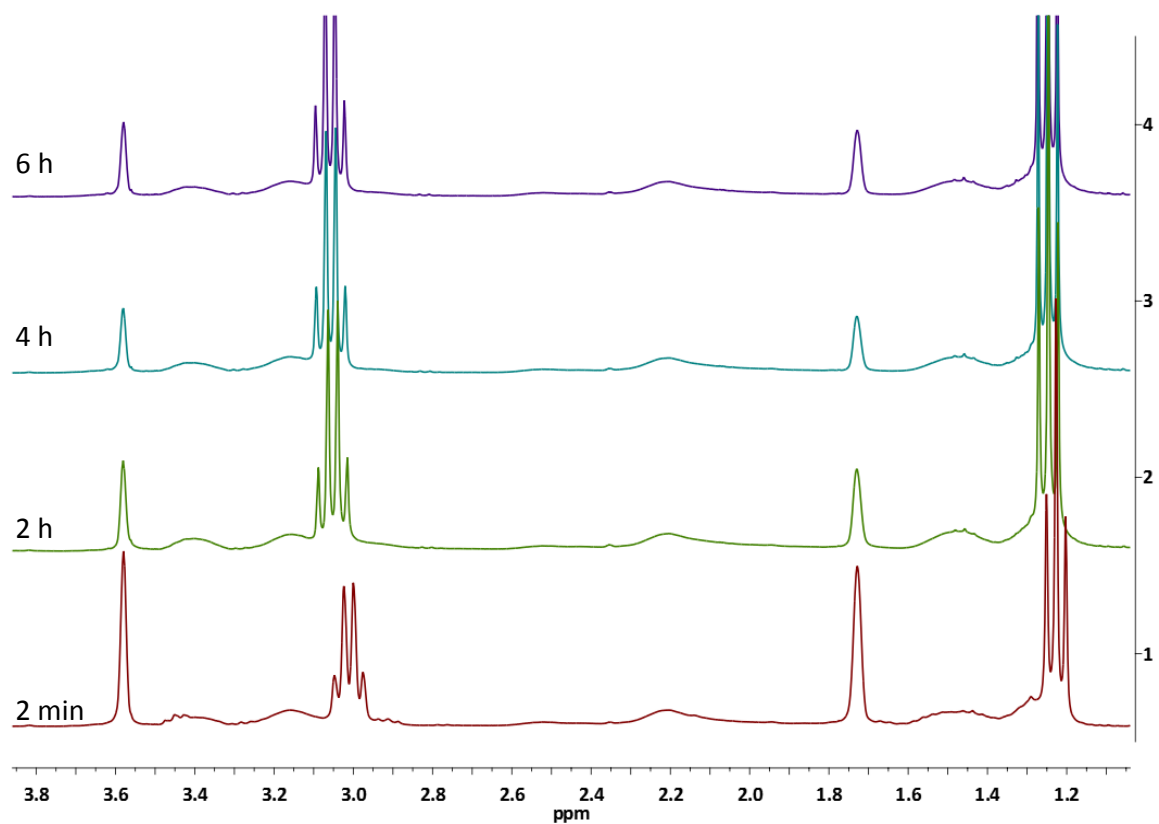


Abbildung 5-15:  $^1\text{H}$ -NMR Spektren im Bereich von 4.0 ppm und 0.5 ppm. Die Spektren wurden nach 2 min, 2 h, 4 h und 6 h nach der Zugabe des Maleimidbausteines **4c** aufgenommen.

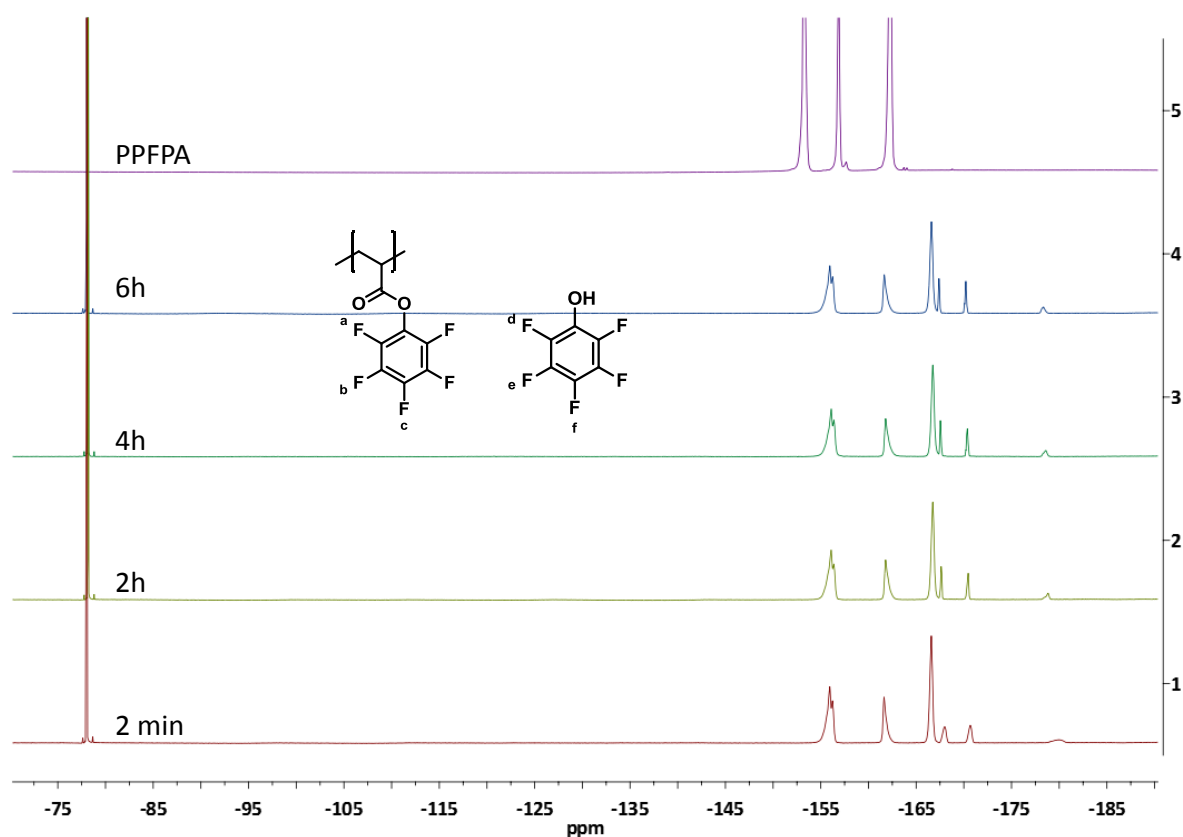


Abbildung 5-16:  $^{19}\text{F}$ -NMR des Reaktionsgemisches nach 2 min, 2 h, 4 h und 6 h in  $\text{THF-}d_8$ , sowie das Spektrum der Ausgangssubstanz **PPFPA** in  $\text{CDCl}_3$ .

Beide zeitaufgelösten NMR-Methoden wiesen auf eine schnelle und abgeschlossene Reaktion des Amins mit dem Aktivester hin. Die Reaktionsbedingungen sind somit für diese Reaktion und auch für diesen Aminobaustein geeignet.



## Darstellung der Terpolymere durch polymeranaloge Umsetzung

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden Terpolymere durch Umsetzung von **PPFPA** mit **4c** (**AHMal**), **15** (**AZEA**) und Dimethylamin hergestellt. Hierfür wurde das Aktivesterpolymer in THF gelöst, **AHMal** und TEA wurden zugegeben. Nach 2 h bzw. nach 20 h wurde bei einigen Ansätzen **AZEA** hinzugeben. Nach weiteren 2 h Reaktionsdauer wurde Dimethylamin hinzugegeben und 16 h gerührt, um die restlichen Aktivestergruppen umzusetzen. Anschließend wurde das Lösemittel unter verminderter Druck entfernt, der Rückstand mit MeOH aufgenommen, in 50 mL Et<sub>2</sub>O gefällt und zentrifugiert. Das ausgefallene Polymer wurde in 40 mL THF gelöst, unlöslicher Feststoff wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde eingengt und die Zusammensetzung des Polymers mit <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht. Hierbei wurden die Intergrale der einzelnen Protonensorten der Seitengruppen betrachtet und ins Verhältnis gesetzt.

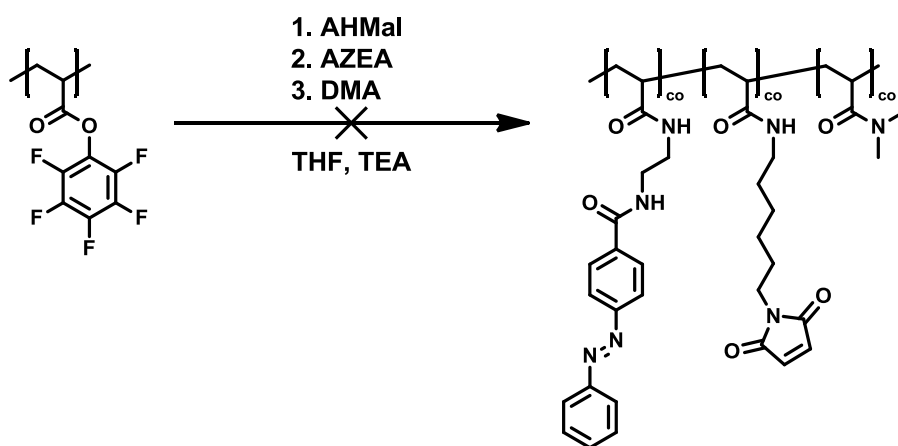


Abbildung 5-17: Syntheschema zur Darstellung der maleimidhaltigen Terpolymere durch polymeranaloge Umsetzung von den Aminobausteinen **4c**, **15** und DMA an **PPFPA**.

Es wurden Polymere mit **AZEA** (10 %, bezogen auf die Menge an Aktivestergruppen) und ohne **AZEA** angesetzt, außerdem wurde der Anteil des Maleimidbausteines **4c** variiert (10 % und 20 %) und die restlichen Aktivestergruppen wurden mit Dimethylamin abgesättigt. Die Polymere konnten mit Ausbeuten von 90 – 96 % dargestellt werden.

In den erhaltenen Spektren konnten die Signale für polymergebundenes **AZEA** und PDMAA gefunden werden. Das Signal für die Maleimidgruppe bei ca. 6.7 ppm konnte nicht detektiert werden. Ein Signal bei 6.9 ppm bis 7.0 ppm wurde zuerst für das Signal der Maleimidgruppe gehalten, jedoch kam dieses vom Stabilisator Butylhydroxytoluol (BHT) des THFs.

Da der Einbau der Maleimidseitengruppe durch die Versuche im NMR-Röhrchen gezeigt werden konnte, jedoch der Einbau im aufgereinigten Copolymer nicht bestätigt werden konnte, gilt es zu überprüfen, in wieweit die Bausteine einen Einfluss auf den Maleimidbaustein haben, oder ob die Aufarbeitung die Maleimidgruppe zerstört.

## Beständigkeit von Aminoethylmaleimid **4c** gegenüber Dimethylamin

Um sicher zu stellen, dass keine Nebenreaktionen zwischen Dimethylamin und Aminoethylmaleimid **4c** auftreten, wurde der Maleimidbaustein **4c** in THF gelöst, TEA und DMA (3 eq.) wurden addiert und die Lösung über Nacht gerührt. Wenn die verwendeten Reaktionsbedingungen keinen Einfluss auf **AHMal** haben, dann ließe sich der Baustein nach dem Entfernen des Lösemittels, der Base und des Reaktionspartner wieder zurück gewinnen.

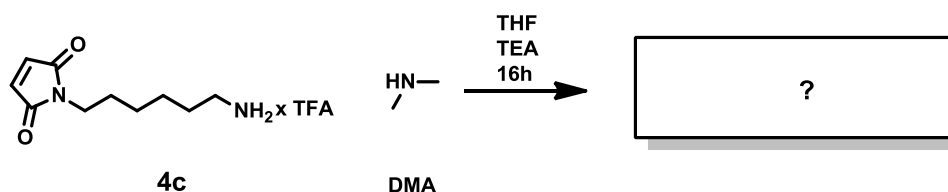
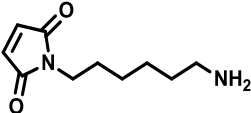
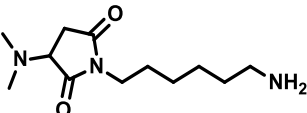
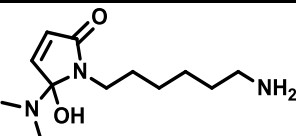


Abbildung 5-18: Umsetzung des Maleimidbausteines **4c** mit Dimethylamin zur Überprüfung der Stabilität von **AHMal** gegenüber Dimethylamin unter den Reaktionsbedingungen.

Nach der Reaktion und dem Entfernen des Lösemittels wurde statt dem wachsartigen Feststoff allerdings ein Öl erhalten. Dieses wurde mit ESI-MS und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie analysiert. Das ESI-MS-Spektrum zeigte überwiegend Signale mit den Massen 242.2 g/mol und 121.7 g/mol, die Masse des **AHMal** Bausteines **4c** konnte nicht mehr detektiert werden, vgl. Tabelle 5-7. Die Signale und die dazugehörigen Integrale im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (Abbildung 5-19) zeigen ebenfalls eine Reaktion des Dimethylamins mit **4c** an. Betrachtet man die Integrale, so kann man die Protonen c – f für den Linker zuordnen, ein neues Signal bei 2.4 ppm erscheint, dieses ist vergleichbar mit dem Ergebnisse aus den Umsetzungen am Polymer. Diverse Signale erscheinen im Bereich zwischen 4.0 ppm und 2.6 ppm, das Signal der Maleimidgruppe bei ca. 6.6 ppm erscheint jedoch nicht mehr.

Die Ergebnisse der ESI-Massenspektrometrie weisen auf eine Reaktion von Dimethylamin mit der Maleimidgruppe hin. Möglich wäre ein nukleophiler Angriff des Stickstoffatoms des Dimethylamins auf das Michael-System oder auf eine Carbonylgruppe des Maleimides **4c**. Mit den gefundenen Massen bei der ESI-Massenspektrometrie und mit dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum können beide postulierten Strukturen (Tabelle 5-7) erklärt werden: das neue entstandene Singulett stammt von den beiden Methylgruppen des addierten Dimethylamins und die Summe der Protonen im aliphatischen Bereich unter 4.0 ppm deckt sich mit der Anzahl für die postulierte Substanz. Diesen Ergebnissen zufolge reagiert Dimethylamin mit der Maleimidgruppe und zerstört sie. Dadurch lässt sich erklären, dass **4c** im Polymer eingebaut werden konnte, jedoch nie – nach der Absättigung der restlichen Aktivestergruppen – detektiert werden konnte. Somit ist eine Umsetzung am Aktivesterpolymer mit **4c** – gefolgt von der Umsetzung mit Dimethylamin – nicht möglich. Die Strategie der polymeranalogen Umsetzung an **PPF-PA** zur Darstellung von maleimidhaltigen Polymeren muss nun verändert werden.

Tabelle 5-7: Aminoethylmaleimid **4c** und postulierte Moleküle, die durch die Reaktion von DMA mit **4c** entstehen könnten, mit den berechneten exakten Massen und die durch ESI-MS detektierten Massen nach der Umsetzung.

Struktur (teilweise postuliert)	Adukt	Exakte Masse /g × mol <sup>-1</sup>	
		ber.:	gef.:
	H <sup>+</sup>	197.1	-
	H <sup>+</sup>	242.2	242.2
	2H <sup>+</sup>	121.6	121.7
	H <sup>+</sup>	242.2	242.2
	2H <sup>+</sup>	121.6	121.7

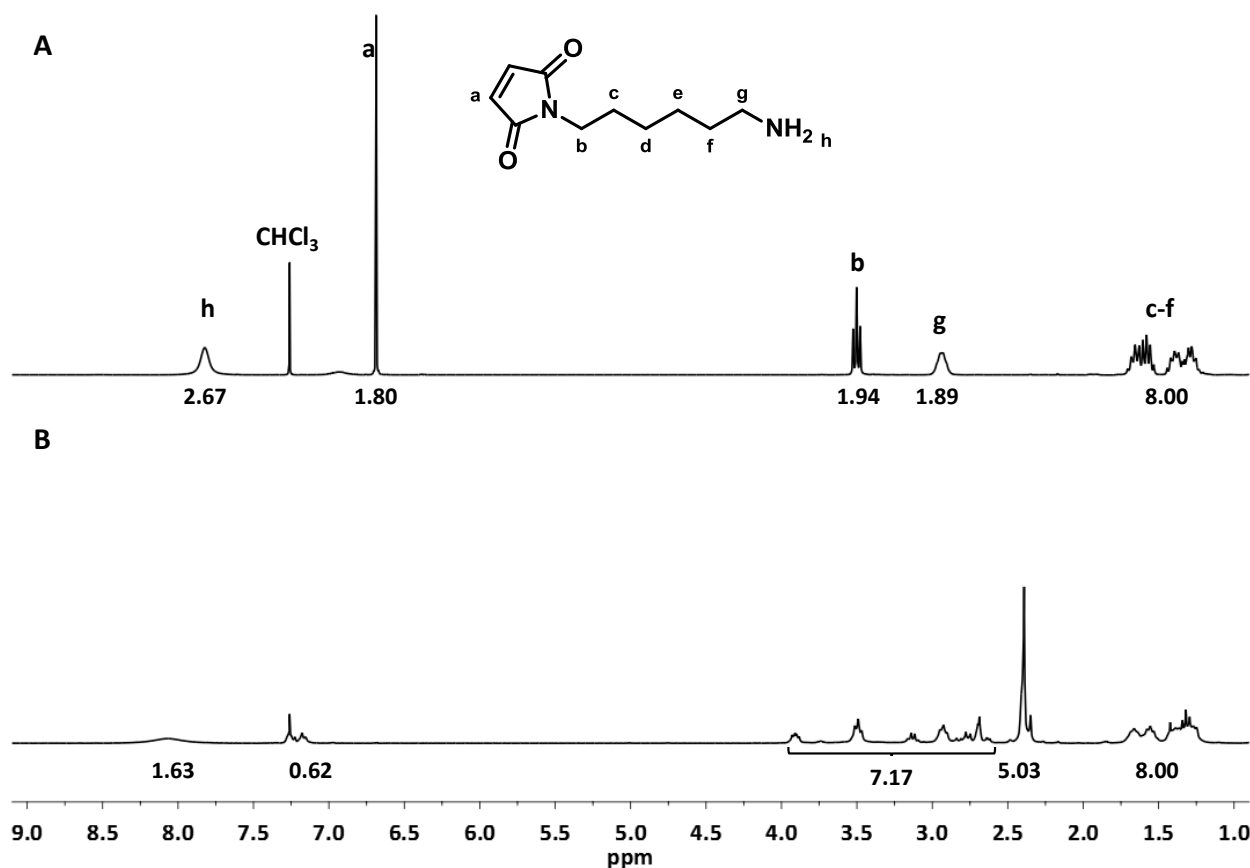


Abbildung 5-19: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Aminoethylmaleimid **4c** in CDCl<sub>3</sub>. A: vor der Umsetzung; B: nach der Umsetzung mit Dimethylamin (unten, B). Zum Vergleich der Intergrale wurden in beiden Spektren die Signale der vier aliphatischen Methylengruppen (c – f) von 1.70 bis 1.1 ppm auf 8 Protonen festgelegt.

## Veränderung der Reihenfolge der Bausteine

Da gezeigt werden konnte, dass Dimethylamin den Maleimidbaustein zerstört, wurde die Reihenfolge der Bausteine bei der Zugabe variiert. Zuerst wurde der größte Anteil der Aktivestergruppen mit Dimethylamin (DMA) umgesetzt, anschließend wurde ein Teil der Gruppen mit **4c** umgesetzt und danach wurden die restlichen Aktivestergruppen mit **15** (AZEA) abgesättigt. Hierbei wurde ein Überschuss von 10 %, bezogen auf die Gesamtmenge an Aktivestergruppen, verwendet (Umsetzung an **PPFPA 1** Variante c).

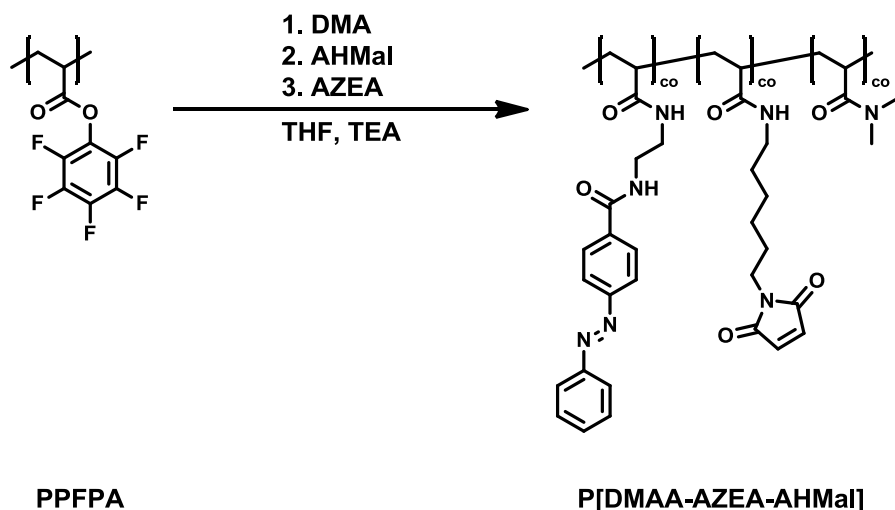


Abbildung 5-20: Syntheschema zur Darstellung der maleimidhaltigen Terpolymere durch polymeranaloge Umsetzung an **PPFPA 1** mit der veränderten Reihenfolge der Aminobausteinen **DMA**, **4c** (**AHMal**) und **15** (**AZEA**).

Tabelle 5-8: Polymerzusammensetzung und Ausbeute der **P[DMAA-AZEA-AHMal]** Polymere nach Umsetzung der Bausteine an **PPFPA 1**.

P[DMAA-AZEA-AHMal]	DMAA		AZEA		AHMal		Ausbeute <sup>a</sup>
Nr.:	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	
in %							
1 <sup>b</sup>	71.0	76.4	19.0	19.1	10.0	4.5	84
2 <sup>b</sup>	83.0	75.2	7.0	20.2	10.0	4.6	82
3 <sup>c</sup>	85.0	76.5	10.0	19.6	5.0	2.6	89
4 <sup>c</sup>	75.0	68.6	15.0	25.0	10.0	6.4	90
5 <sup>c</sup>	75.0	73.1	10.0	17.9	15.0	9.0	95

a: berechnet auf Basis der gefunden Zusammensetzung; b: gefällt und nicht dialysiert, c: gefällt und dialysiert.

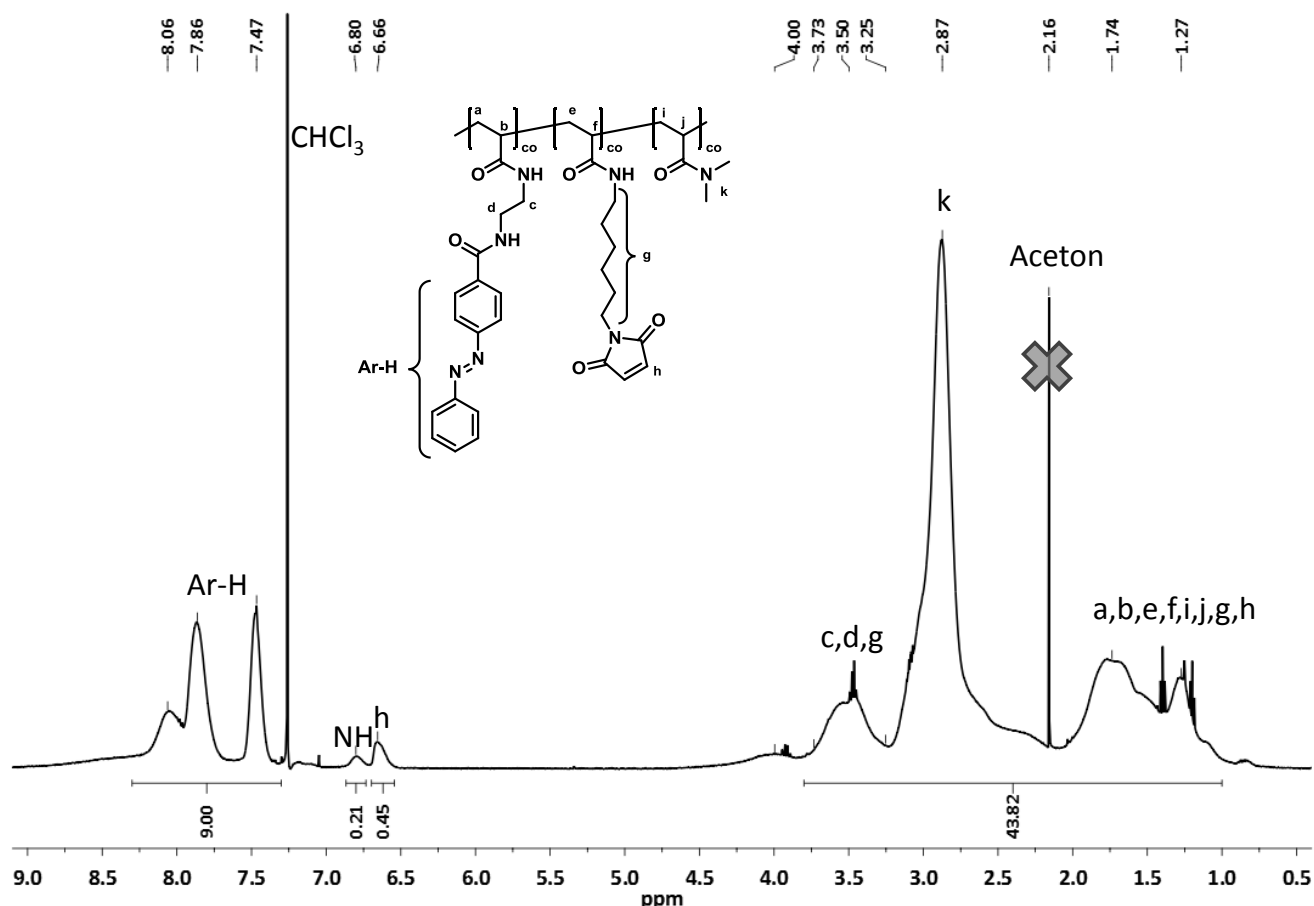


Abbildung 5-21:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum der Probe **P[DMAA-AZEA-AHMal] 2** in  $\text{CDCl}_3$ . Bei 6.6 ppm ist die Maleimidgruppe (h) deutlich sichtbar, ihr Anteil im Polymer beträgt ca. 4.6 %.

Die Maleimidgruppe konnte im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abbildung 5-21) detektiert werden. Ebenso waren Signale für die weiteren Seitengruppen erkennbar, wie die aromatischen Protonen der Azobenzengruppe (Ar-H) oder die Protonen des Dimethylaminacrylats (k). Somit konnten deren Anteile in den Polymeren bestimmt werden. Der Anteil der AHMal-Gruppe war immer geringer als der berechnete Anteil; es konnten nur zwischen 43 und 60 % der gewünschten Menge eingebaut werden. Jedoch war der Anteil des AZEA-Bausteins nach den ersten beiden Synthesen immer höher als erwartet. Um sicherzustellen, dass es sich nicht um Rückstände des AZEA-Bausteines handelt, wurden die Proben dialysiert. Nach der Dialyse konnte kein Unterschied in der Zusammensetzung der Polymere beobachtet werden. Daraus folgte, dass das vorhandene Azobenzene als Seitengruppe im Polymer eingebaut wurde. Außerdem wurde keine Hydrolyse der Maleimidgruppe beobachtet, somit ist eine Dialyse als Aufreinigungsmethode denkbar und wurde für die Polymere **P[DMAA-AZEA-AHMal] 3 – 5** angewendet.

Die gesamte Polymerreihe (**P[DMAA-AZEA-AHMal] 1 – 5**) war jedoch sehr schlecht wasserlöslich. Wässrige Polymerlösungen (bis 1 mg/mL) konnten nicht angesetzt werden, sodass von diesen

---

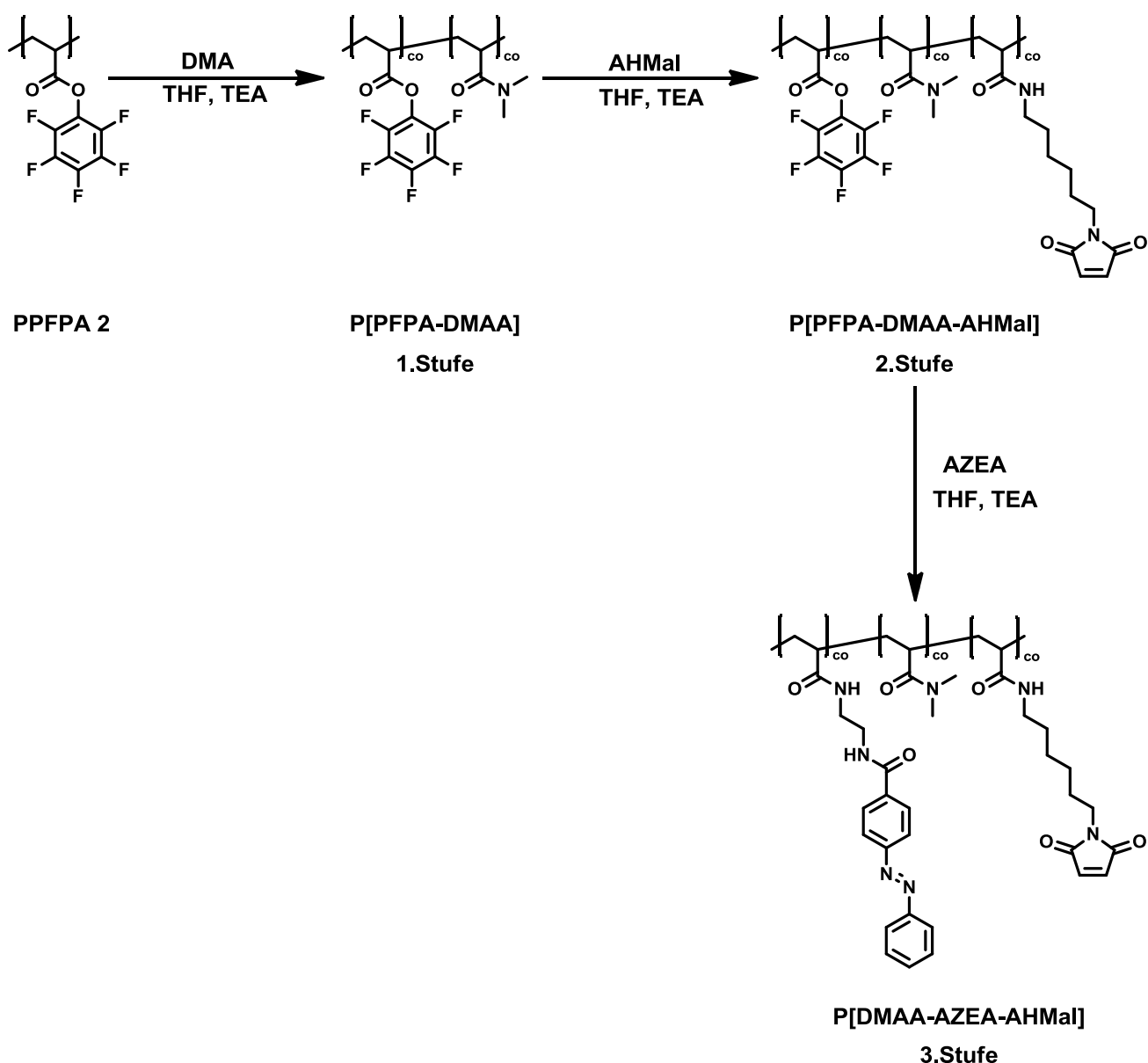
Polymere keine LCST-Werte bestimmt werden konnte. Erst nach einer Umsetzung mit PEG-Thiolen (Kap.: 5.5.2.1) konnten diese Polymere wieder in Lösung gebracht werden.

Eine Veränderung der Reihenfolge bei der Darstellung dieser Terpolymere führte somit zu einem erfolgreichen Einbau der proteinreaktiven Maleimidgruppe. Alle drei gewünschten Seitengruppen konnten im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nachgewiesen werden. Allerdings ist der Anteil des AHMal-Bausteines deutlich geringer als berechnet. Und der Anteil von AZEA im Polymer ist ungewollt zu hoch, teilweise wurde mehr als doppelt so viel wie berechnet eingebaut. Dieses führte zu den schlechten Löslicheitseigenschaften dieser Polymere in Wasser. Die Ursache für den verstärkten Einbau des Azobenzens gegenüber dem Maleimidbausteine wurde nicht weiter untersucht. Möglich wäre, dass die Reaktion von **AHMal** mit dem Aktivesterpolymer durch ausgefallenes Pentafluorphenol-Triethylamin-Salz verlangsamt wird. Dieses bildet sich nach der Zugabe des Dimethylamins und verbleibt als weißer Feststoff in der Reaktionslösung. Eine weitere Möglichkeit ist, dass nach der Umsetzung mit Dimethylamin viele Stellen des Aktivesterpolymers abgesättigt sind, und somit die Reaktion zwischen dem Polymer und weiteren Bausteinen verlangsamt wird.

Diese Problematik, in Kombination mit der Reaktivität von **AHMal** gegenüber Dimethylamin, erschwerte eine Ein-Topf-Synthese-Strategie des gewünschten Copolymers. Eine Aufarbeitung der einzelnen Polymerstufen und anschließende Charakterisierung hinsichtlich ihrer Zusammensetzung vor der weiteren Umsetzung soll den unkontrollierten Einbau verhindern.

#### 5.2.2.5 Sukzessive polymeranaloge Umsetzung zum kontrollierten Einbau von Aminohexylmaleimid

Für den Aufbau der Terpolymere durch polymeranaloge Umsetzungen wurden verschiedene Aminobausteine mit dem Aktivesterpolymer **PPFPA** umgesetzt. Hierbei ist auf die Reihenfolge der Zugabe zu achten. Da Dimethylamin mit der Maleimidgruppe reagieren kann, muss Dimethylamin in der ersten Stufe eingebaut werden. Um den Einbau nach jeder Stufe quantifizieren zu können und um zu vermeiden, dass ausgefallenes Pentafluorphenol-Triethylamin-Salz die Reaktion stören könnte, wurde dieser sukzessive Aufbau in mehreren Reaktionsstufen durchgeführt. Dafür wurde nach jeder Stufe die Reaktion unterbrochen, aufgearbeitet und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mit  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie charakterisiert (Schema 5-14).



Schema 5-14: Darstellung der einzelnen Polymerstufen ausgehend von Polypentafluorphenylacrylat **PPFPA 2** bis zum finalen 3. Stufe **P[AZEA-DMAA-AHMal]**.

Polypentafluorphenylacrylat wurde in THF mit verschiedenen Anteilen Dimethylamins und 1 eq. TEA pro Dimethylamin umgesetzt. Anschließend wurde das Polymer dreimal in der 20-fachen Menge Hexan gefällt und getrocknet, siehe Experimenteller Teil. Eine definierte Menge (20 mg) wurde eingewogen, in DMSO- $d_6$  gelöst, mit 3  $\mu$ L (24.6  $\mu$ mol)  $\alpha,\alpha,\alpha$ -Trifluortoluol versetzt und durch  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie charakterisiert (siehe Abbildung 5-22). Die drei Fluoratome des Trifluortoluols sind äquivalent und generieren somit ein Singulett (a). Dieses Signal wurde als Referenz bei einer Verschiebung bei  $-63.72$  ppm gesetzt. Das Integral dieses Singulett wurde als interner Standard verwendet, um den Anteil der verbliebenen Aktivestergruppen des **PPFPA** und des nicht entfernten Pentafluorphenols (b,c,d) zu berechnen. Durch Fällen des Polymers in Hexan wurde das freigewordene Pen-

tafluorphenol nicht vollständig entfernt. Zur Berechnung der Polymerzusammensetzung muss der Anteil hiervon berechnet und berücksichtigt werden, das Triplett (c) bei  $-168.53$  ppm ermöglicht dieses. Für die Berechnung des Aktivesters wurden die Signale bei  $-155.88$  ppm (e) und  $-160.23$  ppm (g) verwendet, diese stehen für drei Fluorkerne im Aktivesterpolymer. Das dritte Signal (f) lag häufig unter einem weiteren Signal des freien Pentafluorphenols und konnte nicht immer differenziert werden.

Tabelle 5-9: Polymerzusammensetzung nach der Umsetzung mit Dimethylamin bestimmt durch  $^{19}\text{F}$ -NMR.

P[PFPA-DMAA]	PFPA		DMAA		Ausbeute
	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	
	/%				
1	20.0	10.0	80.0	90.0	48
2	15.0	8.2	85.0	91.8	80
3	25.0	24.0	75.0	76.0	84

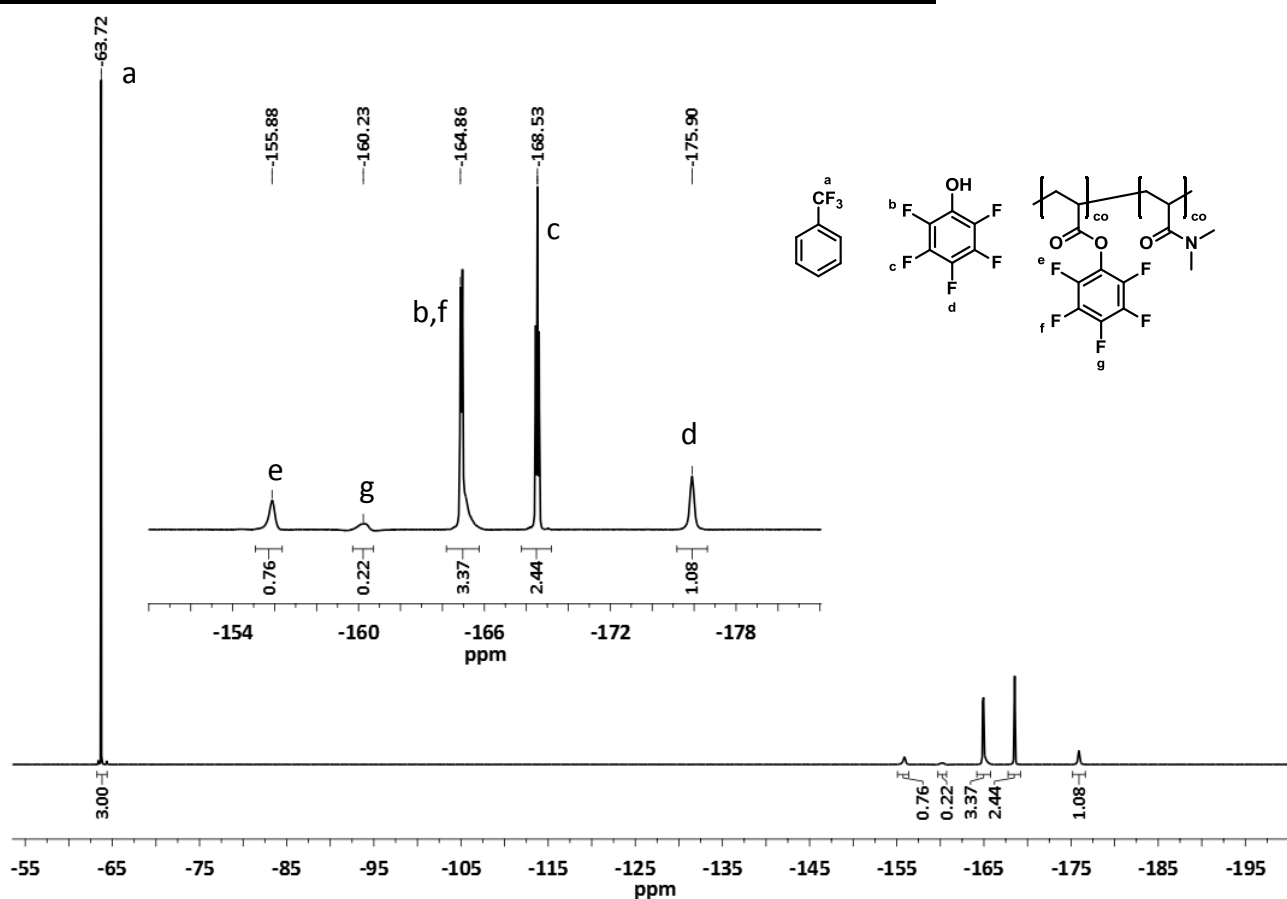


Abbildung 5-22:  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum der ersten Stufe nach der Umsetzung von **PFPA** mit Dimethylamin. Mit dem internen Standard (Trifluortoluol (a) ( $-63.72$  ppm, s, 3F)), kann die Menge an Pentafluorphenol (b – d) und **PFPA** (e – g) bestimmt werden.



Der Anteil des erzeugten Dimethylacrylates und des verbliebenen Pentafluorphenylacrylates konnte bestimmt werden. In der zweiten Stufe wurde die Maleimidgruppe eingebaut. Hierfür wurde das Polymer eingewogen, in THF gelöst und mit dem gewünschten Anteil Aminoethylmaleimid **4c** versetzt. Als Base wurden 2 eq. TEA pro Aminoethylmaleimid zugefügt. Nach 3 h wurde das Polymer dreimal in Hexan gefällt und getrocknet. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Zusammensetzung mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie, gefolgt von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie. Die Probenvorbereitung erfolgte analog der Charakterisierung der ersten Stufe. Der Anteil an Pentafluorphenol und Pentafluorphenylacrylates wurde durch  $^{19}\text{F}$ -NMR bestimmt. Anschließend wurde der Maleimidanteil durch die Integration und das Verhältnis der charakteristischen Signale für Trifluortoluol (7.9 – 7.5 ppm) und für die Maleimidgruppe (7.00 ppm) im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (Abbildung 5-23) bestimmt. Nachfolgend kann der Anteil der DMAA-Seitengruppe berechnet werden.

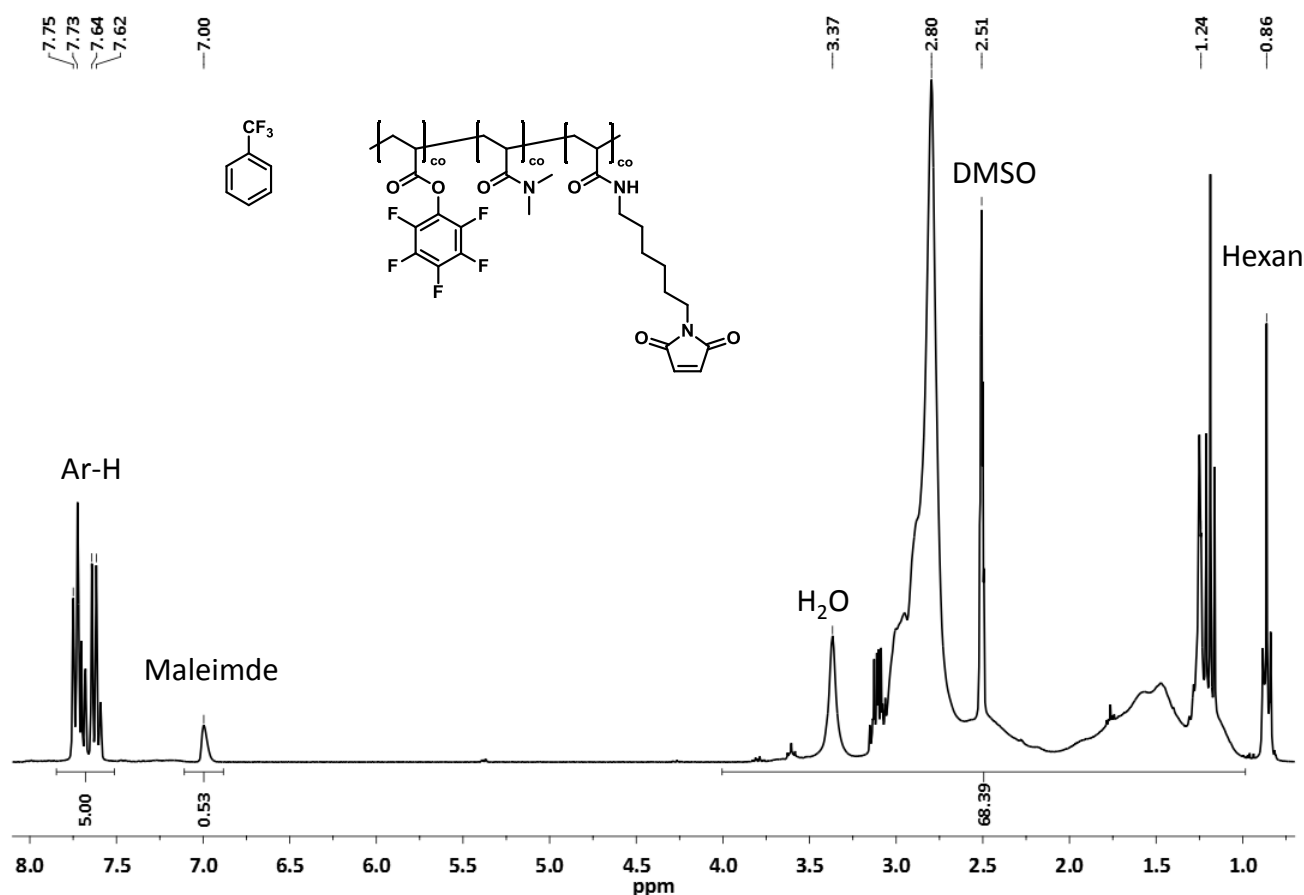


Abbildung 5-23:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Copolymers **P[PFPA-DMAA-AHMal] 6** mit Trifluortoluol als internen Standard in deuteriertem DMSO. Für die Berechnung des Anteils der AHMal-Seitengruppen im Polymer wird das Verhältnis der Integrale der aromatischen Protonen (Ar-H, 7.9 – 7.5 ppm) und der Maleimidgruppe bei 7.00 ppm benötigt.

Tabelle 5-10: Polymerzusammensetzung der **P[PFPA-DMAA-AHMal]** Copolymere nach der Umsetzung mit **4c**, bestimmt durch <sup>1</sup>H- und <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie.

Nr.:	Edukt	PFPA		DMAA		AHMal		Ausbeute
		ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	
	<b>P[PFPA-DMAA]</b>							
					in %			
1	1	5.0	11.0	90.0	83.0	5.0	6.0	98
2	1	9.0	8.8	90.0	90.4	1.0	0.8	>99
3	2	3.2	3.8	91.8	93.9	5.0	2.3	>99
4	2	7.2	5.6	91.8	93.8	1.0	0.6	99
5	3	14.0	7.9	76.0	84.2	10.0	7.9	>99
6	3	19.0	13.4	76.0	82.6	5.0	4.0	>99

In der finalen dritten Stufe wurden die verbliebenen Aktivestergruppen mit dem Azobenzenebaustein umgesetzt. Dafür wurde das Polymer in THF gelöst und mit zwei Äquivalenten **AZEA** pro Aktivestergruppe umgesetzt. Nach 6 h wurde die Reaktionsmischung in Et<sub>2</sub>O gefällt und anschließend gegen Wasser dialysiert (MWCO 3500). Die Zusammensetzung wurde abschließend durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie (Abbildung 5-24) bestimmt. Die komplette Konversion der Aktivestergruppen und die vollständige Entfernung des Pentafluorphenols wurden durch <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie sichergestellt.

Tabelle 5-11: Polymerzusammensetzung der **P[DMAA-AZEA-AHMal]** Copolymere nach der finalen Umsetzung mit **AZEA**; bestimmt durch <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie.

Nr.	AZEA			DMAA			AHMal			Ausbeute	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
	ber.: <sup>a</sup>	ber.: <sup>b</sup>	gef.:	ber.: <sup>a</sup>	ber.: <sup>b</sup>	gef.:	ber.: <sup>a</sup>	ber.: <sup>b</sup>	gef.:			
						in %					/kDa	
6	15.0	11.0	10.6	80.0	83.0	87.5	5.0	6.0	1.9	90	10.9	2.1
7	19.0	8.8	15.2	80.0	90.4	84.6	1.0	0.8	0.2	84	11.7	2.2
8	10.0	3.8	8.0	85.0	93.9	89.7	5.0	2.3	2.3	52	12.2	2.0
9	14.0	5.6	9.6	85.0	93.8	89.9	1.0	0.6	0.5	75	12.5	1.9
10	15.0	7.9	13.7	75.0	84.2	80.2	10.0	7.9	6.1	63	16.1	3.8
11	20.0	13.4	22.3	75.0	82.6	77.1	5.0	4.0	0.6	84	16.6	2.3

a: berechnet vor der Umsetzung mit **4c**; b: berechnet nach der Umsetzung mit **4c** und der anschließenden Charakterisierung.

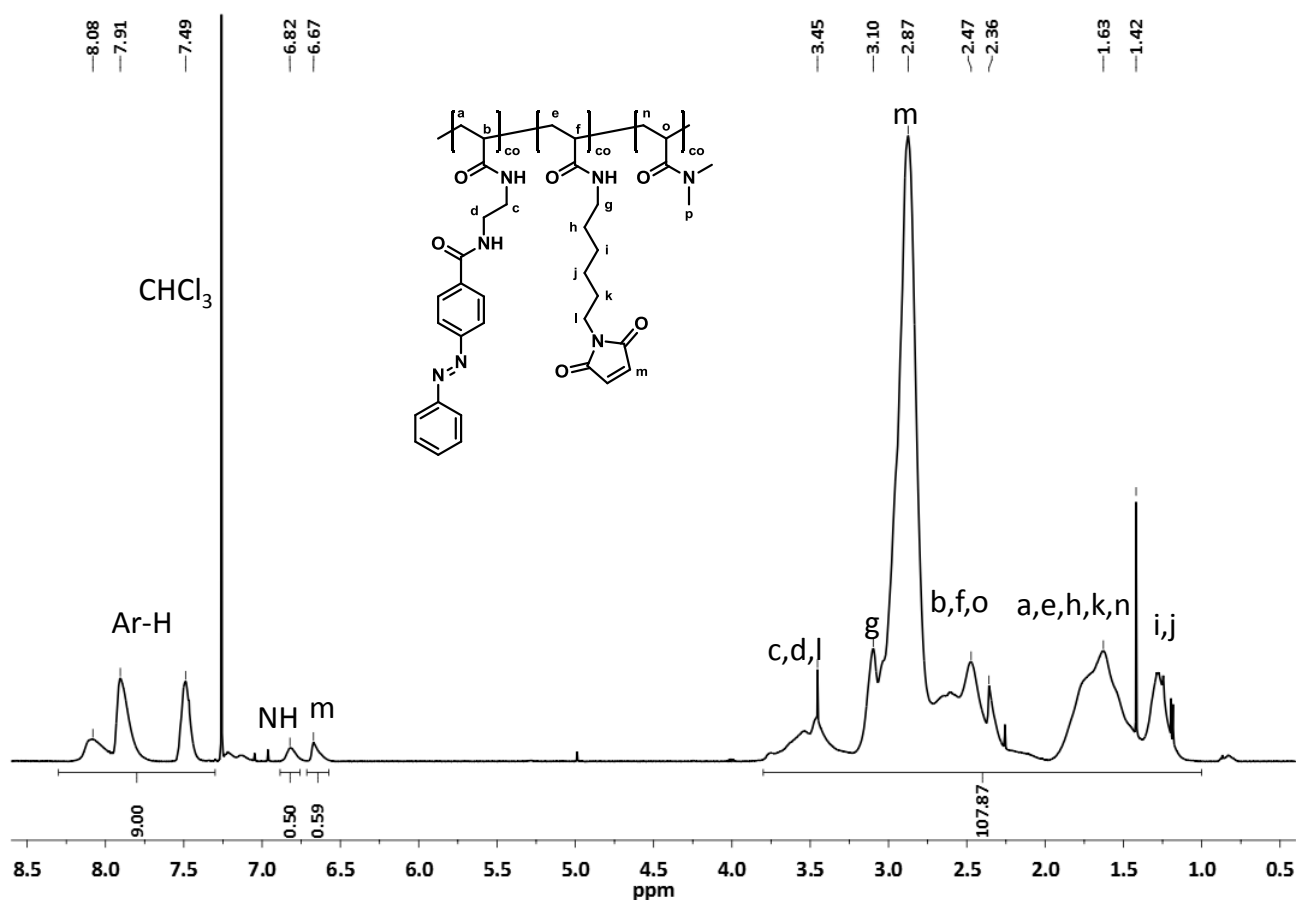


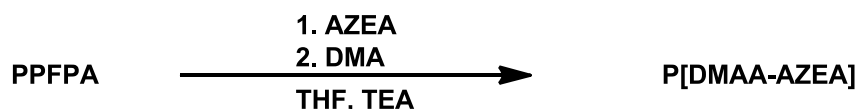
Abbildung 5-24:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **P[DMAA-AZEA-AHMal] 8**. Die Maleimidgruppe erscheint bei 6.67 ppm, ihr Integral lässt sich zur Bestimmung der Polymerzusammensetzung verwenden.

Mit dem dreistufigen Syntheseweg war es möglich, die **P[DMAA-AZEA-AHMal]** Copolymere darzustellen. Die berechneten Zusammensetzungen entsprachen annähernd den vorher geplanten Zusammensetzungen und die Gesamtausbeuten über die drei Stufen betrugen ca. 40 % bis 60 %. Der Vorteil des dreistufigen Syntheseweges gegenüber der Ein-Topf-Synthesestrategie ist die Entfernung des ausgefallenen Pentafluorphenol-Salzes. Dieses könnte einen entscheidenden Einfluss auf den Einbau der Bausteine, wie beispielsweise Aminohexylmaleimid **4c**, haben. Die Charakterisierung der Zwischenstufen zeigte den erfolgreichen Einbau an, ihr Einfluss auf die nächste Stufe ist aber begrenzt.

### 5.2.2.6 P[DMAA-AZEA] Copolymere

Die **P[DMAA-AZEA]** Copolymere wurden als Vergleichspolymere hergestellt. Mit ihnen soll ein möglicher Einfluss der Maleimidgruppe bei der Temperaturschaltung ausgeschlossen werden können. Bei den Copolymeren aus den Bausteinen **AZEA** und Dimethylamin sollte die Reihenfolge der Bausteine bei der Umsetzung mit **PPFPA** nicht entscheidend sein. Somit lässt sich die Umsetzung auf zwei verschiedenen Wegen durchführen: Zum einen kann **AZEA** erst eingebaut werden und anschließend werden die freien Gruppen mit Dimethylamin abgesättigt (Schema 5-15). Der andere Weg verläuft über zwei Stufen, analog der Synthese der **P[DMAA-AZEA-AHMal]** Copolymere. Hierbei wird **PPFPA** erst mit einem Überschuss Dimethylamin umgesetzt, anschließend wird die Zwischenstufe aufgearbeitet, charakterisiert und in der zweiten Stufe mit **AZEA** umgesetzt (Schema 5-16). Die Ergebnisse der beiden Varianten sind in den nachfolgenden Tabellen aufgezeigt.

#### Variante 1: Umsetzung in einer Stufe

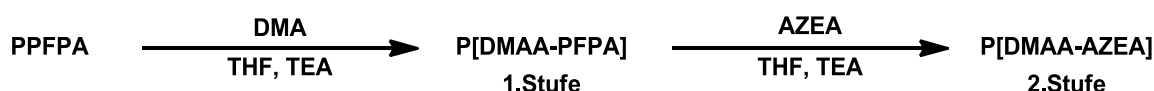


Schema 5-15: Darstellung der Copolymere **P[DMAA-AZEA]** 1 – 5 in einer Stufe durch Umsetzung von **15 (AZEA)** und Dimethylamin (DMA) mit dem Aktivesterpolymer **PPFPA 3**.

Tabelle 5-12: Dargestellte **P[DMAA-AZEA]** Copolymere (Variante 1) und ihre Zusammensetzung.

Polymer	DMAA		AZEA		Ausbeute	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
Nr.:	ber.:	gef.:	ber.:	gef.:			
in %						/kDa	
1	85.0	92.9	15.0	7.1	54	9.4	2.0
2	90.0	94.5	10.0	5.5	81	10.6	1.6
3	85.0	90.0	15.0	10.0	82	12.0	1.5
4	90.0	93.4	10.0	6.6	80	8.5	1.9
5	85.0	88.9	15.0	11.1	86	8.1	1.9

\_\_\_\_\_



Schema 5-16: Darstellung der **P[DMAA-AZEA]** Copolymere über zwei Stufen. In der ersten Stufe wird das **P[DMAA-PFPA]** Copolymer hergestellt, dieses wird aufgereinigt und charakterisiert. Anschließend erfolgt die Reaktion mit **AZEA** in der zweiten Stufe.

Tabelle 5-13: Ergebnisse der Umsetzung zur Darstellung der **P[DMAA-AZEA]** (Variante 2), nach der ersten Stufe.

P[DMAA-PFPA]	Edukt	PFPA		DMAA		Ausbeute <sup>a</sup>
		ber.:	gef.:	ber.:	gef.:	
		in %				
4	PPFPA 2	15.0	9.7	85.0	90.3	89
5	PPFPA 3	10.0	14.6	80.0	85.4	85
6	PPFPA 3	15.0	23.6	85.0	76.4	83

Tabelle 5-14: Ergebnisse der Umsetzung zur Darstellung der **P[DMAA-AZEA]** Variante 2, nach der zweiten Stufe.

P[DMAA-AZEA]	P[DMAA-PFPA]	DMAA			AZEA			Ausbeute	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
		ber.: <sup>a</sup>	ber.: <sup>b</sup>	gef.:	ber.: <sup>a</sup>	ber.: <sup>b</sup>	gef.:			
in %									/kDa	
6	4	85.0	90.3	90.4	15.0	9.7	9.6	88	10.6	1.7
7	5	80.0	85.4	89.9	10.0	14.6	10.1	96	13.0	1.7
8	6	85.0	76.4	81.5	15.0	23.6	18.5	99	13.3	1.7

a: berechneter Anteil vor der ersten Stufe; b: berechneter Anteil nach der ersten Stufe.

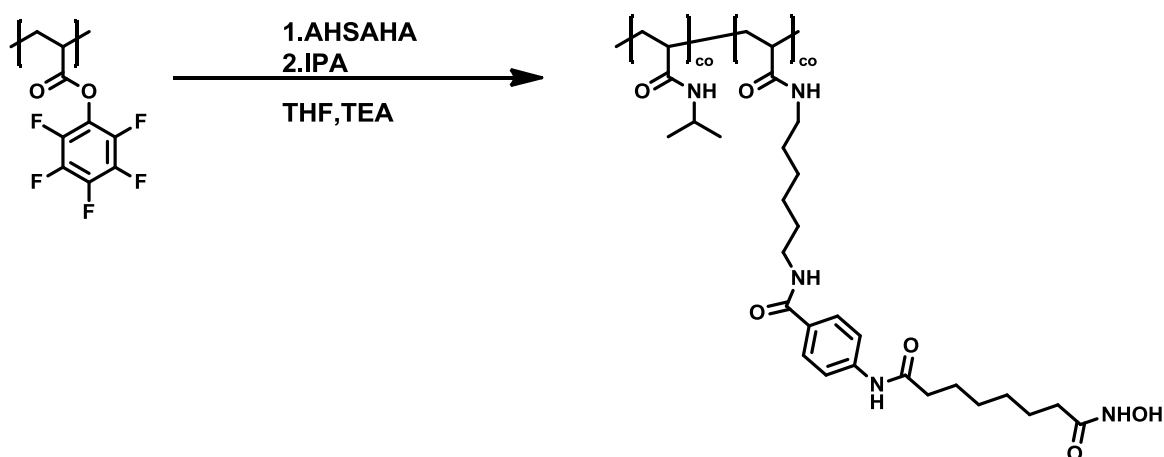
Mit beiden Varianten konnten **P[DMAA-AZEA]** Copolymere hergestellt werden. Variante 1 ist die simplere Variante. Hier wurden allerdings geringere Einbauraten des AZEA-Bausteines erhalten. Die Anteile von **AZEA** in den Polymerzusammensetzungen waren um 3.4 – 7.9 % geringer als die kalkulierten Werte. Die erste Stufe der Variante 2 konnte annähernd wie berechnet dargestellt werden, die relativen Abweichungen betragen maximal 10 %. Die nachfolgende Umsetzung mit **AZEA** lieferte ebenfalls gute Ergebnisse, sodass die absoluten Abweichungen der Anteile der Bausteine im experimentellen Fehlerbereich liegen. Die Gesamtausbeuten der beiden Varianten sind vergleichbar und liegen um die 82 %. Wie schon in Kapitel 5.2.2.5 führte auch hier der sukzessive Einbau über die **P[DMAA-PFPA]** Zwischenstufe zu einer besseren Kontrolle der Polymerzusammensetzung.

### 5.2.2.7 Darstellung anderer Polymere ohne AZEA

Die polymeranalogen Umsetzungen an **PPFPA** können auch ohne **AZEA** und mit anderen Bausteinen erfolgen. Dadurch lassen sich Vergleichspolymere darstellen oder mögliche andere Konzepte hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit prüfen. In diesem Unterkapitel wird die Umsetzung mit den bereits in 5.2.2.2 beschriebenen Aminobausteinen **4c** (**AHMal**), **16** (**BPEA**), **17** (**AHSAHA**), Dimethylamin und Isopropylamin beschrieben und diskutiert.

#### Umsetzung mit dem Aminohexyl-Suberoylanilidhydroxamsäure-Derivat **17** (**AHSAHA**)

Nichtkovalente Protein-Polymer-Bindungen sind ebenfalls eine interessante Anwendungsmöglichkeit für stimulussensitive Polymere. Hierbei wird das Protein nicht konjugiert und es bleibt in seiner ursprünglichen Form. Die Bindung kann dabei über die Oberfläche des Proteins erfolgen (145, 146) oder mit einem spezifischen Liganden, der an das Protein bindet (147, 148). Es ist bekannt, dass Histondeacetylasen eine hohe Affinität zu Hydroxamsäuren besitzen, sodass auch schon Proteinfishing zur Proteomanalyse für diese Enzymklasse mit Derivaten von SAHA betrieben wurde (149). Der dargestellte Aminobaustein **17** (**AHSAHA**) ist ebenfalls ein SAHA-Derivat und kann mit dem Aktivesterpolymer **PPFPA** umgesetzt werden. Ein Unterschuss dieser Gruppe und anschließendes Absättigen der restlichen Aktivestergruppen mit Isopropylamin generiert ein PNIPAAm-Copolymer mit einem inkorporierten Inhibitor.



Schema 5-17: Darstellung von **P[NIPAAm-AHSAHA]** ausgehend von **PPFPA** und die Umsetzung an diesem Aktivesterpolymer.

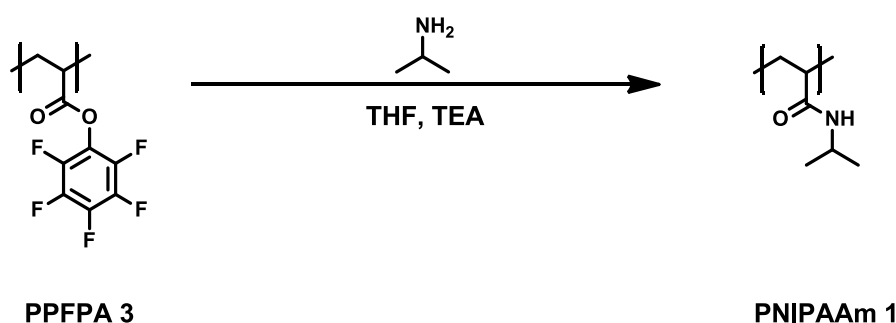
Nach der Dialyse konnte das **P[NIPAAm-AHSAHA]** Copolymer mit 98 % Ausbeute gewonnen werden und wurde anschließend mit  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und GPC charakterisiert. Der Anteil von **AHSAHA** betrug 2 % und war etwas geringer als berechnet (5 %), das mittlere Zahlenmittel ( $M_n$ ) betrug 12.0 kDa bei einem PDI von 1.8. Außerdem wurde der LCST-Wert einer 0.5 %igen Lösung des Polymers bestimmt (Kap.: 5.4.5). Das Polymer wurde hinsichtlich seiner inhibitorischen Fähigkeiten

untersucht. Dafür wurde eine Stammlösung mit einer 50  $\mu\text{M}$  Konzentration des eingebauten **AHSAHA** angesetzt. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert wurde mit 2.5  $\mu\text{M}$  bestimmt und ist somit ca. 100-mal schwächer als der Wert des Aminobausteins **17** (**AHSAHA**). Daraus lässt sich schließen, dass nicht jede Inhibitorgruppe für die Bindung an das Protein zur Verfügung stand. Diese Präsenz ließe sich temperaturabhängig steuern, sodass Polymere mit stimulussensitiven, proteinaffinen Eigenschaften generiert werden könnten.

Solche Polymere sind für Anwendungen in der Affinitätschromatographie sehr interessant: Als Ligand könnten neben Inhibitoren auch Nitrilotriessigsäurederivate eingesetzt werden, mit dieser Methode könnten dann rekombinant produzierte Proteine mit einen Polyhistidin-Tag aufgereinigt werden.

### Umsetzung mit Isopropylamin und Darstellung von **PNIPAAm**

Poly(*N*-isopropylacrylamid) ist das bekannteste stimulussensitive Polymer. Das Ansprechverhalten einer **PNIPAAm**-Lösung bei Temperaturänderung ist bekannt, **PNIPAAm** kann somit als Referenzpolymer dienen. Durch Umsetzung von **PPFPA 3** mit Isopropylamin (Schema 5-18) konnte dieses Polymer analog der Synthese der **AZEA**-Polymere dargestellt werden.

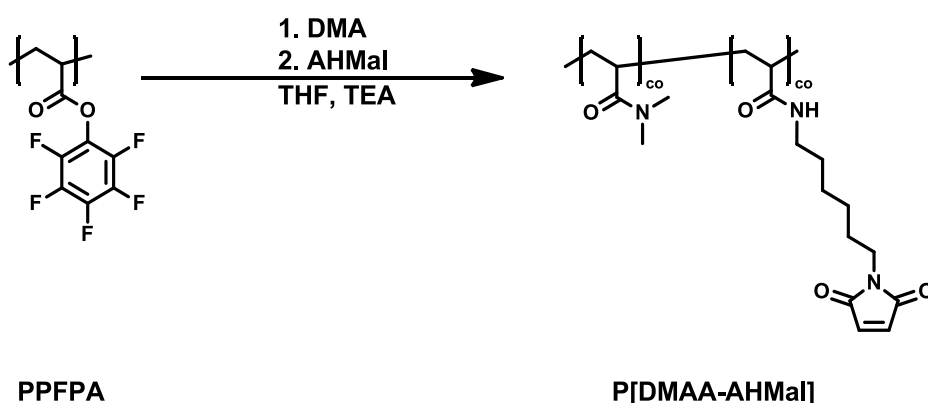


Schema 5-18: Darstellung von **PNIPAAm 1** durch polymeranaloge Umsetzung mit Isopropylamin an **PPFPA 3**.

Die Ausbeute (76 %), die mittlere Molmasse (19.4 kDa) und der Dispersionsgrad (1.5) waren mit den anderen polymeranalogen Umsetzungen an **PPFPA** vergleichbar. Dieses Polymer wurde als Kontrollpolymer für die zyklische Schaltung (Kapitel 5.4) verwendet. Des Weiteren wurde **PNIPAAm 2**, als weiteres Referenzpolymer, durch radikalische Polymerisation hergestellt.

## Umsetzung mit Aminoethylmaleimid und Darstellung von P[DMAA-AHMal]

Um den Einfluss des Maleimidbausteines **4c** auf die LCST zu bestimmen, wurden Copolymere durch Umsetzung von Dimethylamin und Aminoethylmaleimid **4c** mit **PPFPA** dargestellt. Da Dimethylamin (DMA) den Maleimidbaustein zerstört, muss DMA im ersten Schritt in das Polymer eingebaut werden. Dafür wurden einige Aktivestergruppen des **PPFPA** mit Dimethylamin umgesetzt, anschließend wurden die restlichen Gruppen mit einem Überschuss an Maleimid **4c** (AHMal) amidiert, siehe Schema 5-19. Nach der Umsetzung wurde das Polymer gefällt, dialysiert und getrocknet.



Schema 5-19: Darstellung der **P[DMAA-AHMal]** Copolymere durch Umsetzung von Dimethylamin an **PPFPA**, gefolgt von der Umsetzung mit Aminoethylmaleimid.

Die Synthese wurde auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt. Die Darstellung von **P[DMAA-AHMal]** **1** verlief ausgehend von **PPFPA** **2** über die Zwischenstufe **P[DMAA-PFPA]** **4** (siehe Kap. 5.2.2.6), danach erfolgte die Umsetzung mit dem Maleimid **4c**. **P[DMAA-AHMal]** **2** wurde in einer Eintopfreaktion dargestellt. Nach der Reaktion mit Dimethylamin wurde ein Überschuss von Maleimid **4c** zugegeben. Die Ergebnisse der Synthesen sind in Tabelle 5-15 dargestellt. Die Zusammensetzungen wurden durch die Integrale der charakteristischen Gruppen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abbildung 5-25) bestimmt.

Tabelle 5-15: Berechnete und gefundene Zusammensetzungen der **P[DMAA-AHMal]** Copolymere.

<b>P[DMAA-AHMal]</b>	<b>DMAA</b>		<b>AHMal</b>		<b>Ausbeute</b>	<b>M<sub>n</sub></b>	<b>M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub></b>
	ber.:/%	gef.:/%	ber.:/%	gef.:/%			
<b>1</b>	85.0	98.3	15.0	1.7	43	16.4	2.3
<b>2</b>	80.0	85.2	20.0	14.8	56	10.3 <sup>a</sup>	3.1

a: schlecht filtrierbar.



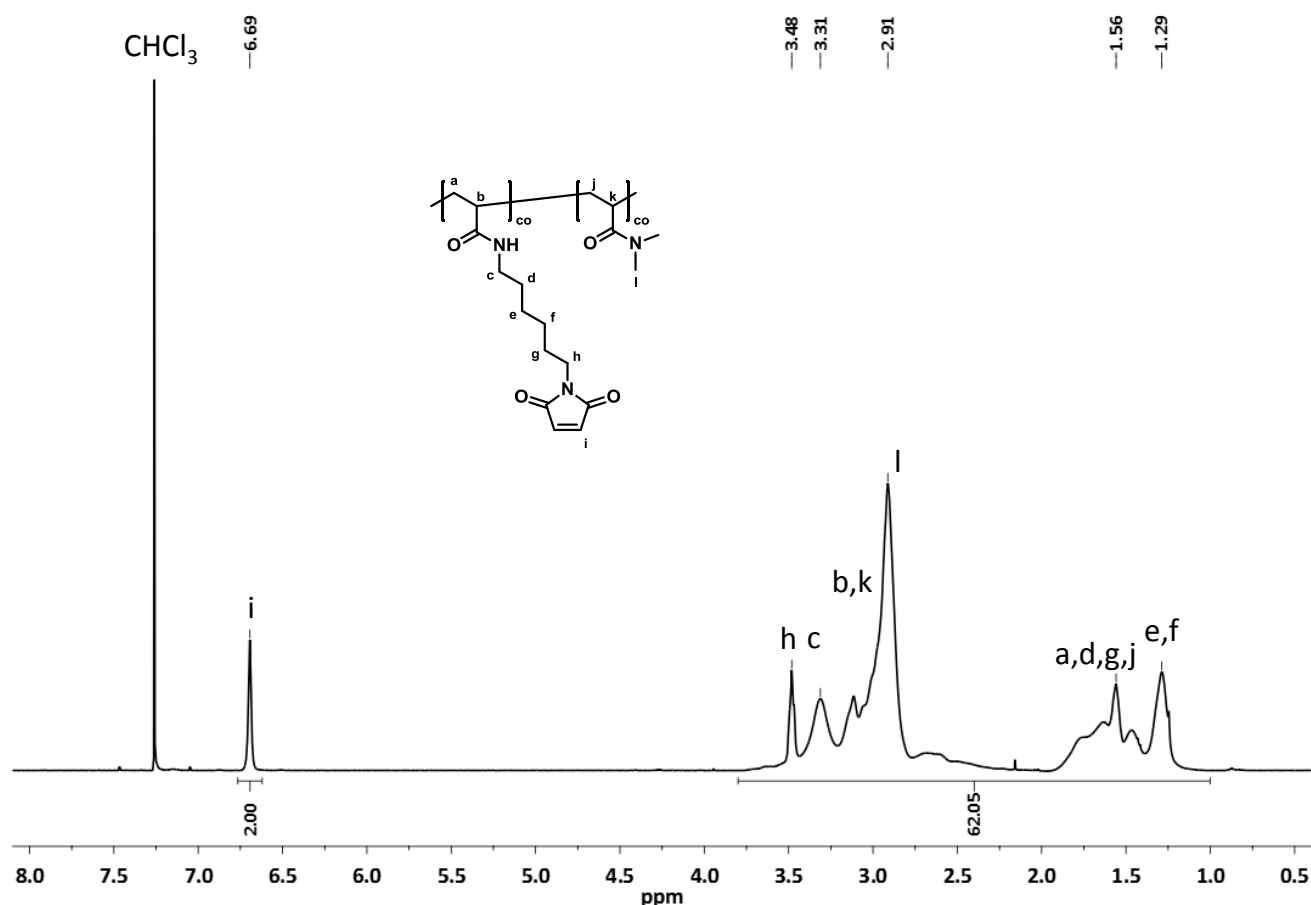


Abbildung 5-25:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **P[DMAA-AHMal] 2** in  $\text{CDCl}_3$ . Der Einbau des Maleimidbausteines lässt sich u. a. durch die Signale bei 6.69 ppm (l), 3.48 ppm (h) und 1.29 ppm (e,f) verifizieren.

In der zweistufigen Variante **P[DMAA-AHMal] 1** wurde wesentlich weniger des Bausteines **AHMal** eingebaut als berechnet. Mit der einstufigen Synthese konnte das Maleimidpolymer **P[DMAA-AHMal] 2** mit einem hohen Anteil an **AHMal** dargestellt werden. Dieses ist zur Generierung einer LCST des **P[DMAA-AHMal]** Copolymers entscheidend.

### Umsetzung mit Biphenylethylenamin (BPEA) und Darstellung von **P[DMAA-BPEA]**

Als Vergleichsbaustein für **AZEA** wurde Biphenylethylamidamin **16** (**BPEA**) dargestellt und nachfolgend mit **PPFPA 3** umgesetzt, um ein vergleichbares Copolymer zu bekommen. Dieses wurde mit einer Ausbeute von 72 % erhalten, die Zusammensetzung des Copolymers entsprach der berechneten Zusammensetzung (gef.: 10.8 %; ber.: 10.0 %). Das Polymer war jedoch weder in Chloroform, Tetrahydrofuran noch in Methanol oder Dimethylsulfoxid löslich, allerdings ließ es sich in Wasser lösen. Wegen der schlechten Löslichkeit in organischen Lösemitteln konnten keine vergleichbaren Molmassenbestimmungen durchgeführt werden.

### 5.3 Bestimmung des Isomerisierungsgrades

Die beiden Isomere von Azobenzen können durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneter Wellenlänge und Intensität ineinander überführt werden (siehe Abbildung 5-26). Jedoch erfolgt die Isomerisierung nicht immer vollständig, man erhält einen photostationären Zustand mit verschiedenen Anteilen des *E*- und des *Z*-Isomers. Um eine Aussage über die Effektivität der Photoschaltung geben zu können, bedarf es der Kenntnis über die Verhältnisse der Isomere nach der Bestrahlung. Die Absorptionsspektren der Isomere unterscheiden sich in ihren charakteristischen Maxima für die elektronischen Übergänge. Jedoch überlagern sich die UV-Banden beider Isomere, sodass eine quantitative Bestimmung alleine durch die photometrische Messung nicht möglich ist. Die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie müssen deshalb mit Ergebnisse einer zweiten Charakterisierungsmethode korreliert werden. Protonen-NMR-Spektroskopie bietet sich als Referenzmethode an, da Änderungen der chemischen Umgebung – wie sie bei der Isomerisierung entstehen – nachgewiesen werden können. Es wurden zuerst UV/Vis-Spektren des Azobenzenbausteines **15** in verschiedenen Lösemitteln, bei verschiedenen Konzentrationen und nach verschiedenen Bestrahlungszeiten aufgenommen. Hiermit ließen sich die Extinktionskoeffizienten für die Übergänge  $\pi \rightarrow \pi^*$  und  $n \rightarrow \pi^*$  bestimmen und mit der Literatur vergleichen. Diese liegen laut Literatur (150) für die *trans*-Konfiguration bei  $2 - 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ , 330 nm) und  $400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  ( $n \rightarrow \pi^*$ , 440 nm), und für die *cis*-Konfiguration bei  $5 - 7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ , 330 nm) bzw. ca.  $1500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  ( $n \rightarrow \pi^*$ , 440 nm). Anschließend wurde **15** in deuteriertem DMSO gelöst und sukzessiv mit UV-Licht bestrahlt. Sobald keine Änderung mehr für den  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang zu beobachten war, wurde die Lösung durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Ergebnisse wurden nachfolgend auf ein azobenzenhaltiges Polymer übertragen und die Lichtschaltbarkeit des Polymers in Dimethylsulfoxid und Wasser betrachtet.

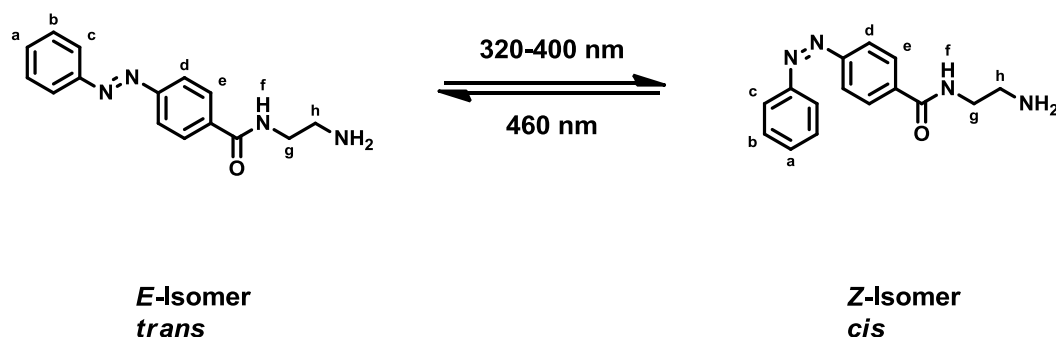


Abbildung 5-26: Die beiden Isomere des Bausteines **15** (**AZEA**) mit der Kennzeichnung der einzelnen Protonen. Chemisch äquivalente Protonen und die der primären Aminogruppe sind nicht gekennzeichnet.

### 5.3.1 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten und des photostationären Zustandes von AZEA

#### 5.3.1.1 UV/Vis-Spektroskopie

Hierfür wurde je eine 5 mM Lösung des Bausteines **15** in DMSO und Dioxan angesetzt. In Wasser war das Molekül nicht löslich, deshalb wurden diese Spektren durch Verdünnen der DMSO-Lösung mit Wasser erstellt. Es wurden Spektren in einer Konzentration von 0.5 mM und 0.05 mM aufgenommen (siehe Abbildung 5-27). Die Spektren wurden vor der Bestrahlung (0 min) nach der Bestrahlung mit UV-Licht (siehe Kap. 4, Isomerisierung von Azobenzen), (5 min, 320 nm; 10 min, 320 nm) und nach der Bestrahlung mit visuellen Licht (5 min, 460 nm; 10 min, 460 nm) aufgenommen. Mit den Extinktionen der verschiedenen Isomere ließen sich die Extinktionskoeffizienten für die beiden Übergänge der beiden Isomere bestimmen (Tabelle 5-16).

Tabelle 5-16: Extinktionskoeffizienten von AZEA in verschiedenen Lösemitteln bei verschiedenen Wellenlängen und nach Bestrahlung.

Wellenlänge / nm		Extinktionskoeffizient $\epsilon$ / L $\times$ mol <sup>-1</sup> $\times$ cm <sup>-1</sup>		
		DMSO	Dioxan	Wasser
<i>trans</i>	330	31340	27300	22500
	440	707	889	1121
<i>cis</i>	330	3260	4300	5520
	440	1386	1656	1782
$\epsilon_{440\text{ nm}}$ <i>trans/cis</i> in %		51	54	63

In Abhängigkeit der Lösemittel zeigt das Molekül verschiedene Absorptionsmaxima. Charakteristisch für die Konversion in das *cis*-Isomer ist die starke Abnahme des Maximums bei ca. 330 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) und die Zunahme des Absorption bei ca. 440 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ), diese ist verbunden mit einer leichten Verschiebung des Maximums zu niedrigeren Wellenlängen. Die Unterschiede zwischen den beiden Zuständen sind auch für konzentriertere Lösungen bei 440 nm gut zu erkennen und lassen sich bei dieser Wellenlänge in ein Verhältnis setzen, um die Isomerisierbarkeit zu beschreiben. Demnach erfolgt die Isomerisierung in DMSO und Dioxan effizienter als in Wasser. Dieses kann auch durch die Absorptionen für den  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang festgestellt werden. Die bestimmten Extinktionskoeffizienten sind mit den Literaturwerten (150) vergleichbar.

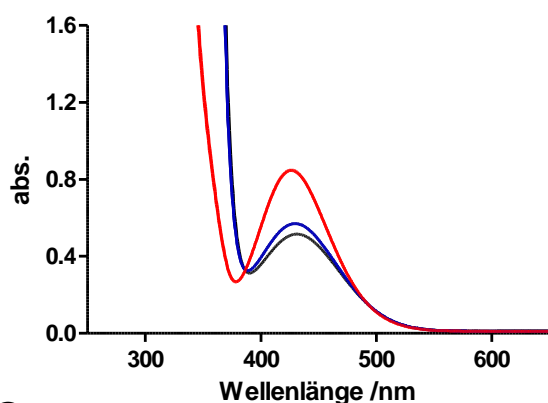
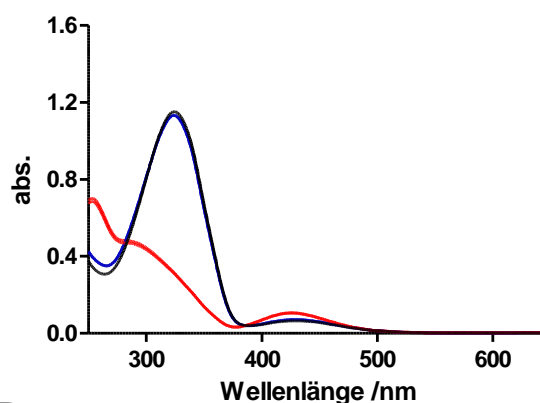
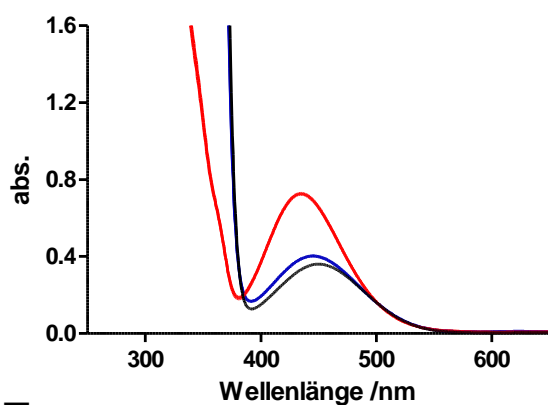
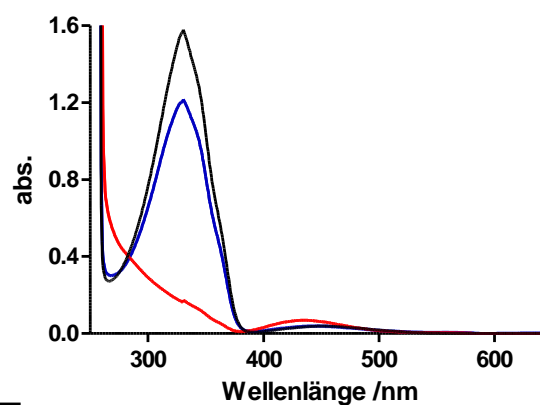
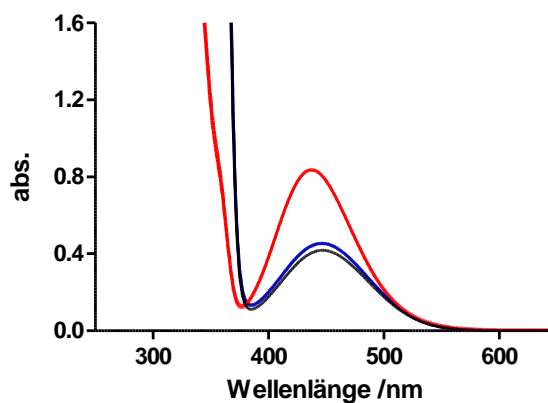
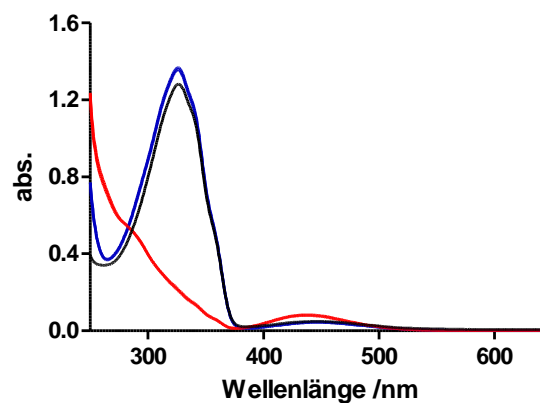
**A****B****C****D****E****F**

Abbildung 5-27: UV/Vis- Spektren von **AZEA** in verschiedenen Lösemitteln, Konzentrationen und Konfigurationen. A: Wasser, 0.5 mM; B: Wasser, 0.05 mM; C: DMSO, 0.5 mM; D: DMSO, 0.05 mM; E: Dioxan, 0.5 mM; F: Dioxan, 0.05 mM. (schwarz: vor der Bestrahlung; rot: 10 min bei 320 nm; blau: 10 min bei 460 nm). Bei einer Bestrahlungsdauer von 10 Minuten war weder bei Licht einer Wellenlänge von 320 nm, noch bei der Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 460 nm, ein Unterschied zu dem Spektrum nach 5 Minuten zu beobachten, sodass die Unterschiede der Spektren in der Abbildung nicht sichtbar sind.

### 5.3.1.2 NMR-Spektroskopie

Nachfolgend wurde der Baustein **15** in DMSO- $d_6$  gelöst (28.4 mg/mL, 106 mM) und mit UV-Licht sukzessiv bestrahlt. Um den Isomerisierungsprozess zu visualisieren (Abbildung 5-28 A), wurde alle fünf Minuten Proben aus der Lösung genommen, 1:200 verdünnt und ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen. Nach dem Erreichen des Maximums für den  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang wurde die Extinktion der Probenlösung bei 440 nm und bei 30 °C gegen die Zeit gemessen (Abbildung 5-28 B).

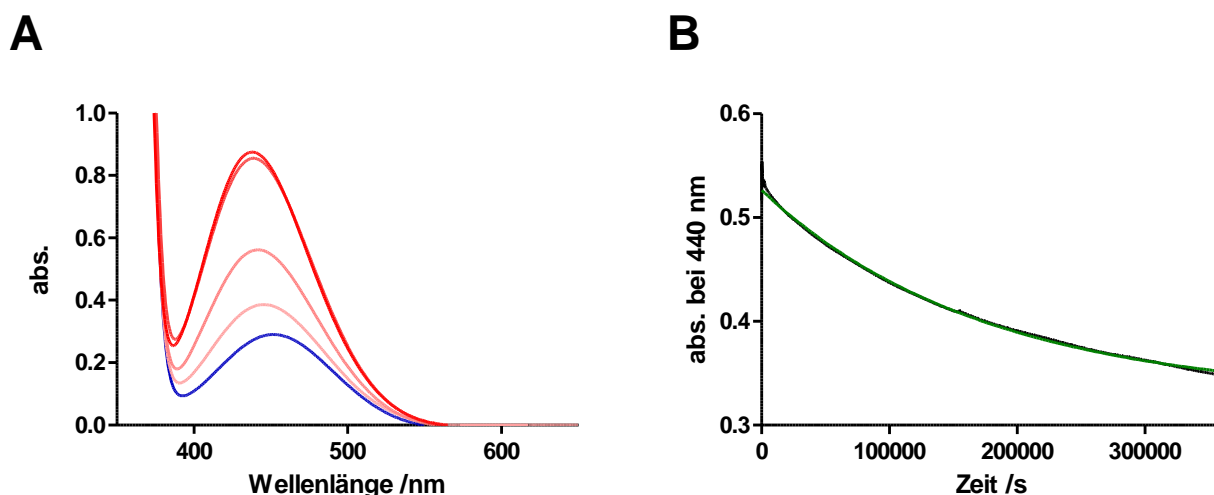


Abbildung 5-28: A: UV/Vis Spektren von **AZEA** in DMSO (530  $\mu$ M) nach Bestrahlung der NMR-Probenlösung mit UV-Licht (5–20 min). Die blaue Kurve zeigt die Extinktion vor der Bestrahlung (0 min), die rötlichen Kurven zeigen die Extinktion nach 5 min, 10 min, 15 min und 20 min Bestrahlung mit UV-Licht an. B: Thermische Relaxation von **AZEA** in DMSO (530  $\mu$ M) bei 30 °C. Aufgetragen ist die Absorption des  $n \rightarrow \pi^*$  Überganges bei 440 nm (schwarz) und das inexplizite Regressionsmodell (grün).

Der maximale Anteil für das *cis*-Isomer wurde erst nach einer Bestrahlungsdauer von 20 min erreicht. Die bestimmte Extinktion betrug 0.874 und korreliert mit dem vorher bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten. Jedoch verlief die Isomerisierung langsamer als bei der Isomerisierung der 0.5 mM Lösung (Abbildung 5-27, C). Dieses lässt sich mit der ca. 200-fach höheren Konzentration innerhalb der bestrahlten NMR-Lösung erklären. Beim Erreichen des Maximums wurde die konzentrierte Lösung durch Kernspinresonanzspektroskopie untersucht (Abbildung 5-29 bis Abbildung 5-31). Die verdünnte Lösung wurde bei 30 °C hinsichtlich ihres Relaxationsverhaltens untersucht. Die thermische Relaxation wurde mit derselben Probenlösung wie das Spektrum in Abbildung 5-28 A, 20 min bestimmt. Jedoch ist vor Beginn der Messung schon ein großer Teil zurück isomerisiert, sodass die Relaxationsmessung bei einer Extinktion von 0.550 startet. Das inexplizite Regressionsmodell gibt eine Halbwertszeit von 33 h an. Die thermische Relaxation, die bis zur Aufnahme des NMR-Spektrums stattfindet, ist somit zu vernachlässigen.

Für die exakte Zuordnung der einzelnen aromatischen Protonen im Isomerengemisch wurden die zweidimensionalen NMR-Spektroskopiemethoden COSY (Abbildung 5-29) und NOESY (Abbildung 5-30) verwendet. Hiermit konnten die Signale über ihre skalaren Kopplungen den beiden Isomeren zugeordnet werden. Eine Kopplung durch den Raum zwischen den Protonen c und d des *cis*-Isomer wurde vermutet, konnten allerdings aufgrund der ähnlichen Verschiebungen nicht im NOESY-Spektrum (Abbildung 5-30) gefunden werden. Indes konnte eine Kopplung zwischen dem amidischen Proton *f* und den aromatischen Protonen *e* (vgl. Abbildung 5-26) bei beiden Isomeren detektiert werden.

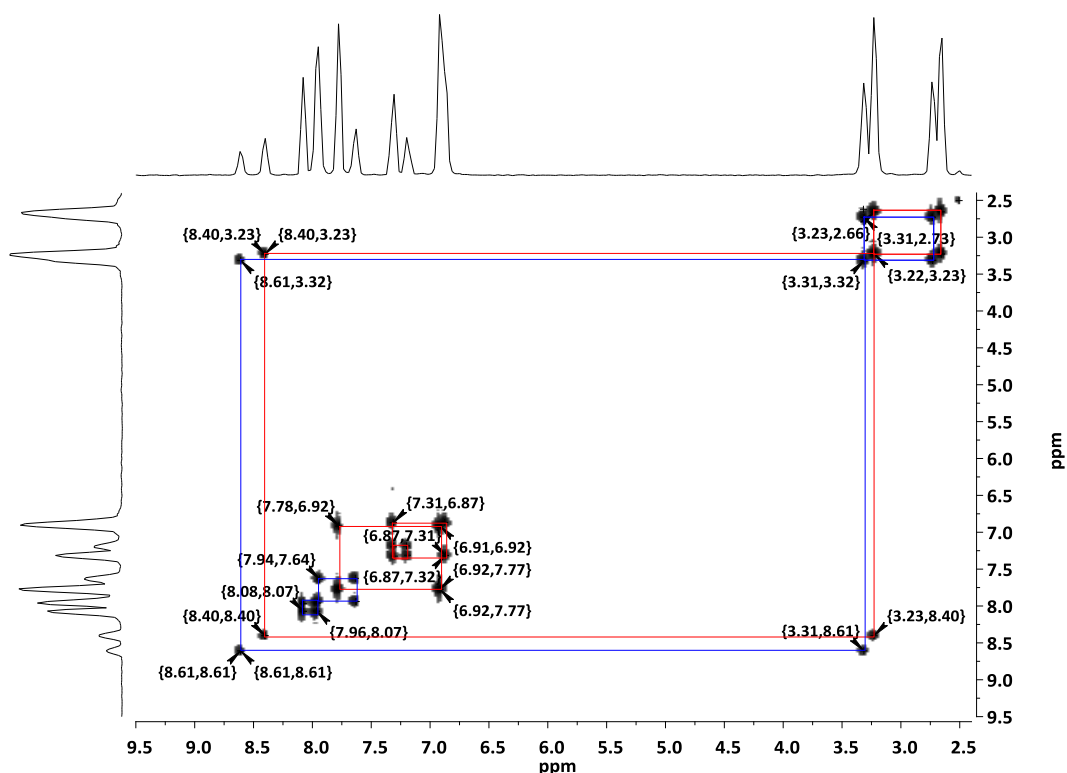


Abbildung 5-29:  $^1\text{H}$ -COSY Spektrum von **15** (AZE) nach Bestrahlung mit UV-Licht.

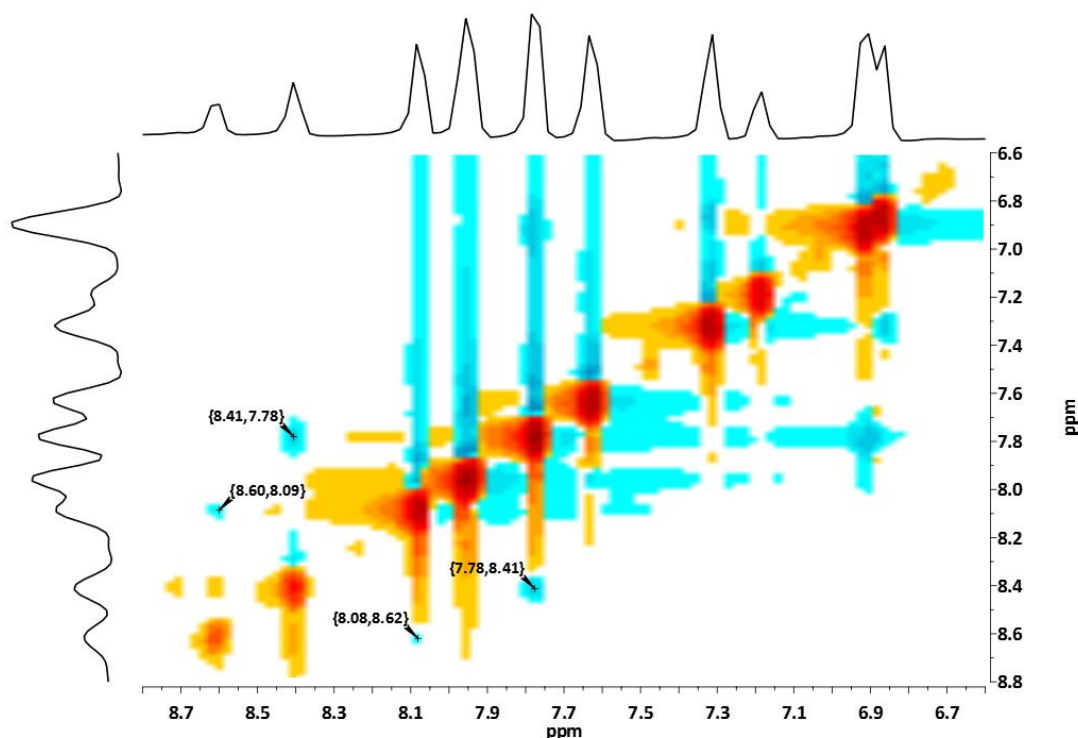


Abbildung 5-30:  $^1\text{H}$ -NOESY Spektrum von **15** (AZE) nach Bestrahlung mit UV-Licht. Die Protonen *f* und *e* beider Isomere erzeugen Kreuzsignale durch Kopplungen durch den Raum, (8.60, 8.09; *trans*-Isomer; 8.41, 7.78, *cis*-Isomer).

Im eindimensionalen Protonenspektrum (Abbildung 5-31) sind nach der Isomerisierung deutlich mehr Signale zu beobachten als vor der Bestrahlung. Vor der Bestrahlung mit UV-Licht lagen alle Signale der aromatischen Protonen bei über 7.50 ppm, nun sind drei neue Peaks (b; a; c, d) im Aromatenbereich und unter 7.50 ppm aufgetreten; des Weiteren ein Triplett (f) bei 8.39 ppm, ein Duplett (e) bei 7.76 ppm und ein Triplett (h) bei 2.64 ppm. Alle diese Signale lassen sich dem *Z*-Isomer zuordnen. Der immense Einfluss der Isomerisierung zum *cis*-Isomer, und der damit verbundenen Dipolmomentänderung, führte zu einer Verschiebung bei allen Protonen des Moleküls. Sogar die amidischen (f) und die Protonen am Ende des Ethyllinkers (h) besitzen geringere chemische Verschiebungen als die des *trans*-Isomers. Der größte Einfluss durch die Isomerisierung konnte bei den Protonen (c, d) in direkter Nachbarschaft zu der Azogruppe festgestellt werden. Das Verhältnis für die Intergrale des *cis*- und des *trans*-Isomers kann nun bestimmt werden. Das Integral der Methylengruppe (g) des Ethyllinkers wurde für die Berechnung nicht berücksichtigt, da es von dem Signal des eingetragenen Wasser bei 3.32 ppm überlagert wurde. Somit wurde das *cis*-/*trans*-Verhältnis der Isomere in der NMR-Lösung nach der Bestrahlung mit UV-Licht, und damit der photostationären Zustand bei der maximalen Isomerisierung, bestimmt. In der Lösung lag das *Z*-Isomer zu 60 % und *E*-Isomer zu 40 % vor.

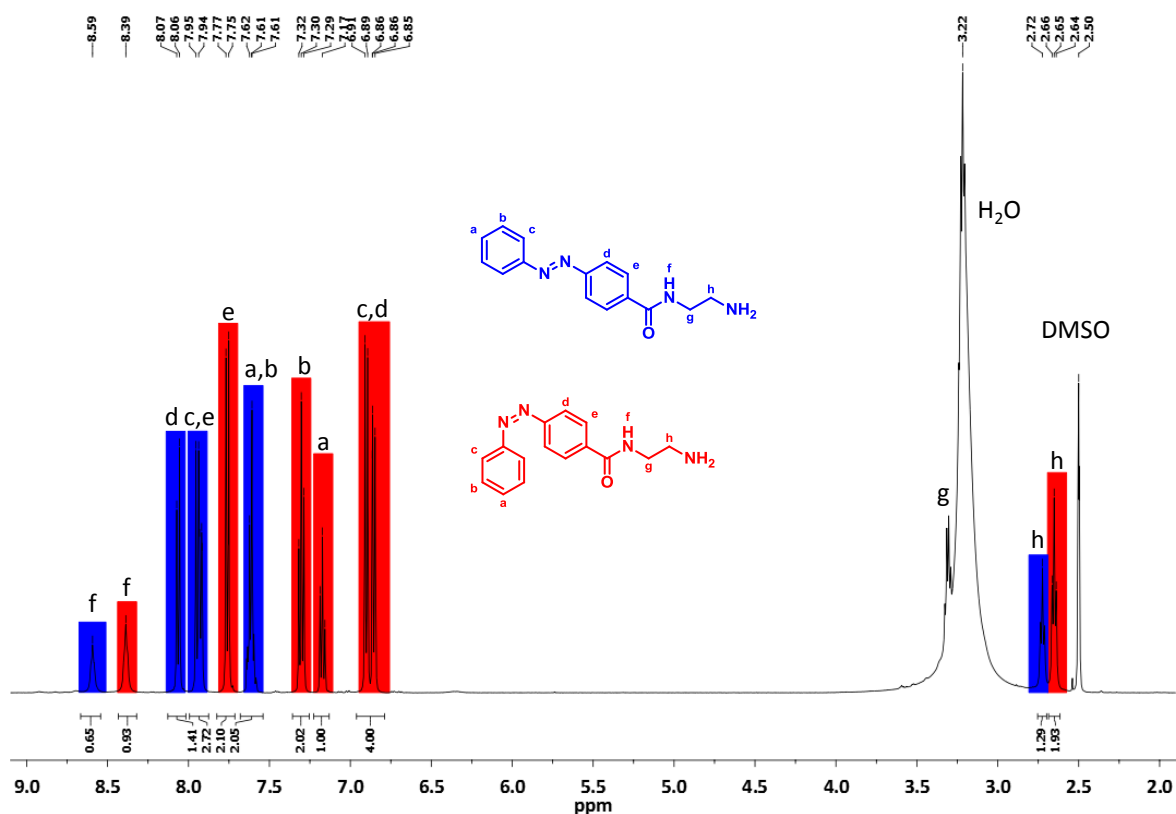


Abbildung 5-31: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von **15** (AZE) in DMSO-*d*<sub>6</sub> nach Bestrahlung mit UV-Licht. Die Protonen des *trans*-Isomers sind im Spektrum blau hinterlegt, die Protonen des *cis*-Isomers sind rot hinterlegt. Aus dem Integralverhältnis des beiden Isomere ergibt sich ein *cis*/*trans*-Verhältnis von 60 % zu 40 %.

Bei maximaler Bestrahlung der Lösung konnte somit nur ein Isomerisierungsgrad des Azobenzenbausteines **15** von 60 % in DMSO erreicht werden. Die Differenzierung der beiden Isomere des Monomerbausteines im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum wurde nachfolgend zur Bestimmung des Isomerisierungsgrades eines azobenzenhaltigen Polymers verwendet.

### 5.3.2 Extinktionskoeffizient und photostationärer Zustand von polymergebundenen AZEA

#### 5.3.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Um eine Aussage zum Grad der Isomerisierung in verschiedenen Lösemitteln zu treffen, wurde ein Azobenzen enthaltendes Polymer **P[AZEA-DMAA] 6** in deuteriertem Lösemitteln (DMSO-*d*<sub>6</sub> und D<sub>2</sub>O) gelöst (12.5 mg/mL). Das verwendete Polymer hatte einen AZEA-Anteil von 9.7 % (n/n<sub>Polymer</sub>) dieses entspricht 26 % (m/m<sub>Polymer</sub>) **AZEA**, beziehungsweise 10 mM **AZEA** in den angesetzten Lösungen. Die Lösungen wurden mit UV-Licht bestrahlt (siehe Kap. 4) und mittels UV/Vis-Spektroskopie



untersucht (Abbildung 5-32). Dafür wurden von den Polymerlösungen in fünfminütigen Abständen Proben genommen, verdünnt (1:10) und ein UV-Spektrum aufgenommen, um die maximale Schaltung zu visualisieren. Durch die Verdünnung und der eingesetzten Polymerkonzentration betrug die Konzentration an **AZEA** in der Probenlösung 1 mM **AZEA**, somit ließ sich der Extinktionskoeffizient leicht berechnen und mit dem des freien **AZEA**s vergleichen.

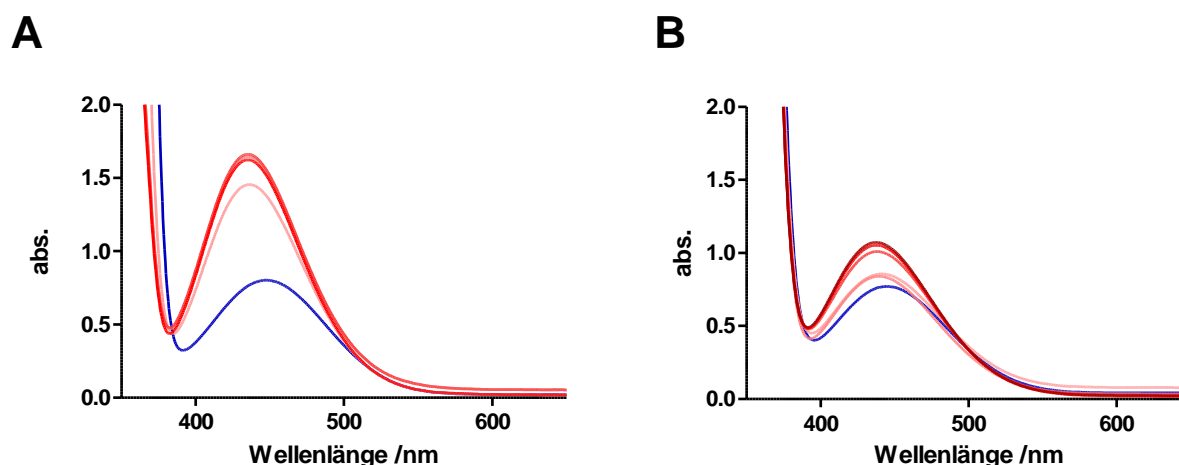


Abbildung 5-32: UV/Vis- Spektren von **P[DMAA-AZEA] 6** in Abhängigkeit der Bestrahlungsdauer. A: Polymerlösung in DMSO- $d_6$ , B: Polymerlösung in  $D_2O$ . Die Polymerkonzentration in der gemessenen Lösung betrug 1.25 mg/mL. Die blauen Kurven zeigen die Extinktion vor der Bestrahlung (0 min), die rötlichen Kurven zeigen die Extinktion nach 5 min, 10 min, 15 min und 20 min (25 min B) Bestrahlung mit UV-Licht an.

Beide Polymerlösungen zeigten vor Beginn der Bestrahlung (0 min) vergleichbare Werte für die Absorption bei 440 nm (0.787 in DMSO und 0.766 in Wasser), somit eine vergleichbare Konzentration. Für die Polymerlösung in DMSO konnte jedoch durch die Bestrahlung ein höherer Isomerisierungsgrad erreicht werden. Nach 10 min hat die Isomerisierung ihr Maximum erreicht (1.607), weitere Bestrahlung führte nicht zur einer wesentlichen Änderung des Spektrums. In Wasser erfolgte die Isomerisierung zu einem geringen Anteil. Die Absorption für den  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang bei 440 nm veränderte sich nur geringfügig und betrug nach 25 min lediglich 1.070 abs. Vergleicht man die bestimmten Extinktionskoeffizienten mit denen des ungebundenen Azobenzenbausteines **15** in DMSO und in Wasser (Kap. 5.3.1.1), so erkennt man, dass in DMSO vergleichbare Werte erreicht werden konnten. Die bestimmten Extinktionskoeffizienten der Isomerformen sind ähnlich. Unterschiede lassen sich unter anderem durch die Fehleranfälligkeit bei der Bausteinkonzentrationsbestimmung mittels  $^1H$ -NMR erklären. Der relative Unterschied des Extinktionskoeffizienten bei 440 nm zwischen „trans“ und „cis“ und beträgt 51 % für das freie **AZEA** und 49 % für polymergebundenes **AZEA** in DMSO. In Wasser beträgt dieser relative Unterschied 63 % für das freie und 72 % für das polymergebundene **AZEA**. Hieraus lässt sich folgern,

---

dass das **AZEA** sich nicht nur schlechter in Wasser schalten lässt, sondern auch, dass die Bindung an das Polymerrückgrad die Schaltungseffizienz in Wasser mindert.

#### 5.3.2.2 NMR-Spektroskopie

Nachfolgend wurden die bestrahlten Polymerlösungen in den deuterierten Lösemitteln mit  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie hinsichtlich ihres *cis*- und *trans*-Isomerenverhältnisses charakterisiert und mit den unbestrahlten Lösungen verglichen. Abbildung 5-33 zeigt den Aromatenbereich vom  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Polymers **P[DMAA-AZEA] 6** vor der Bestrahlung (0 min). Die erkennbaren Signale für die Protonen a bis d des *cis*-Isomers sind rot hinterlegt, die Protonen e und f lassen sich dem Spektrum nicht eindeutig zuweisen. Aus dem Verhältnis der Integrale des *cis*- und des *trans*-Isomers ergibt sich ein Anteil des *trans*-Isomers von 97 %. In Abbildung 5-34 ist das NMR-Spektrum der Probe nach der Bestrahlung mit UV-Licht dargestellt, der erhöhte Anteil an *cis*-Isomer (rot hinterlegt) ist deutlich zu erkennen. Die Signale der Azobenzengruppe im Polymer treten bei ähnlichen Verschiebungen auf wie beim freien Baustein. Aus dem Integralverhältnissen lässt sich *Z/E*-Verhältnis von 76 %/ 24 % berechnen.

Die übereinandergelegten Spektren des unbestrahlten (blau) und bestrahlten (rot) Polymers in  $\text{D}_2\text{O}$  (Abbildung 5-35) sind weniger scharf aufgelöst. Die einzelnen Signale lassen sich weder in der unbestrahlten Probe (blau), noch in der bestrahlten Probe, eindeutig einzelnen Protonen zuordnen. Somit lässt sich keine Aussage über das Verhältnis zwischen den Anteilen der *cis* und *trans*-Isomere treffen. Lediglich eine leichte Verschiebung der Signale der Aromatenprotonen zu niedrigeren Werten konnte beobachtet werden. Die Ähnlichkeit der beiden Spektren hinsichtlich ihrer Verschiebung und Form deutet auf eine geringe Isomerisierung hin.

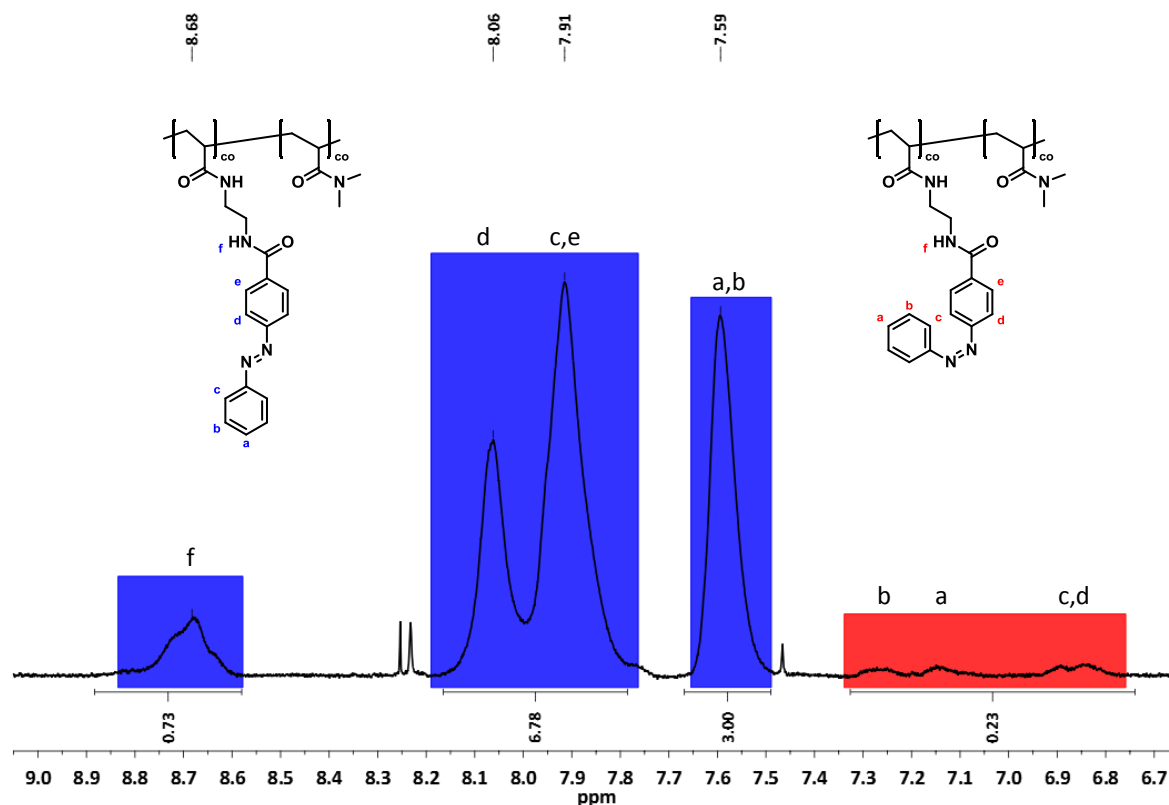


Abbildung 5-33:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **P[DMAA-AZEA] 6** in  $\text{DMSO}-d_6$  (12.5 mg/mL) mit erhöhten Anteil (97 %) des *trans*-Isomers (blau hinterlegt) gegenüber dem *cis*-Isomer (rot hinterlegt).

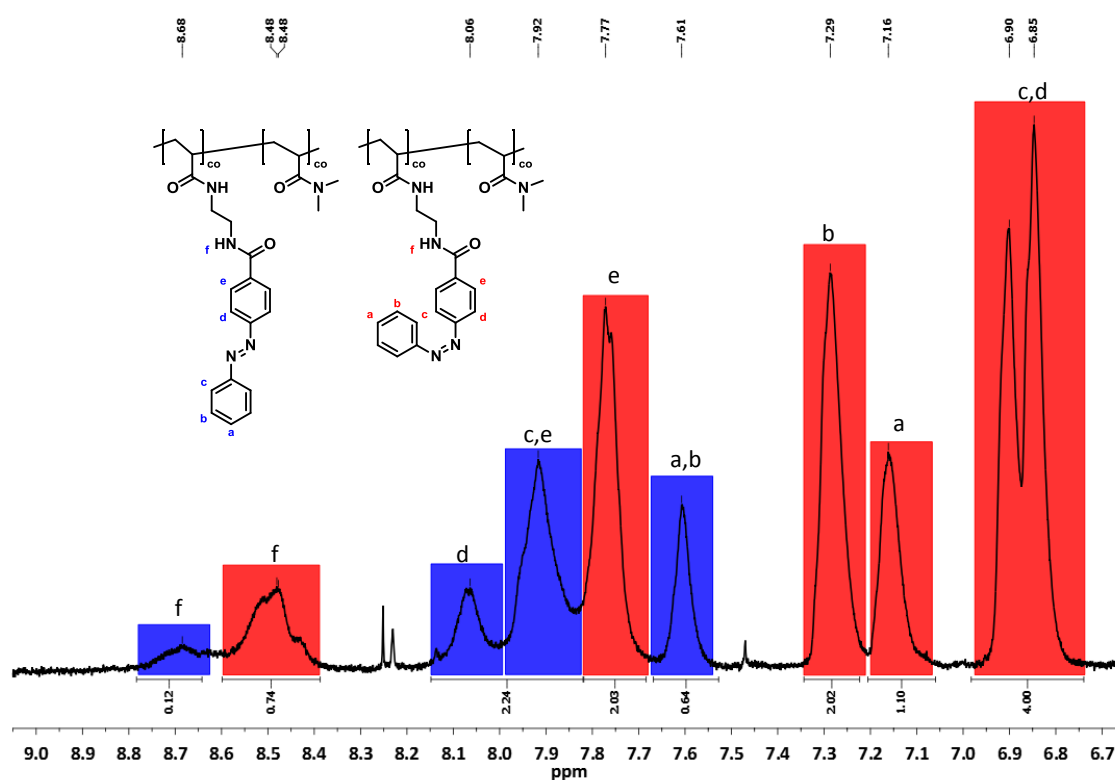


Abbildung 5-34:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **P[DMAA-AZEA] 6** in  $\text{DMSO}-d_6$  nach Bestrahlung mit UV-Licht. Der Anteil des *cis*-Isomers (rot hinterlegt) ist gegenüber dem *trans*-Isomer (blau) erhöht. Das Verhältnis beträgt 76 %/24 % *cis* zu *trans*.

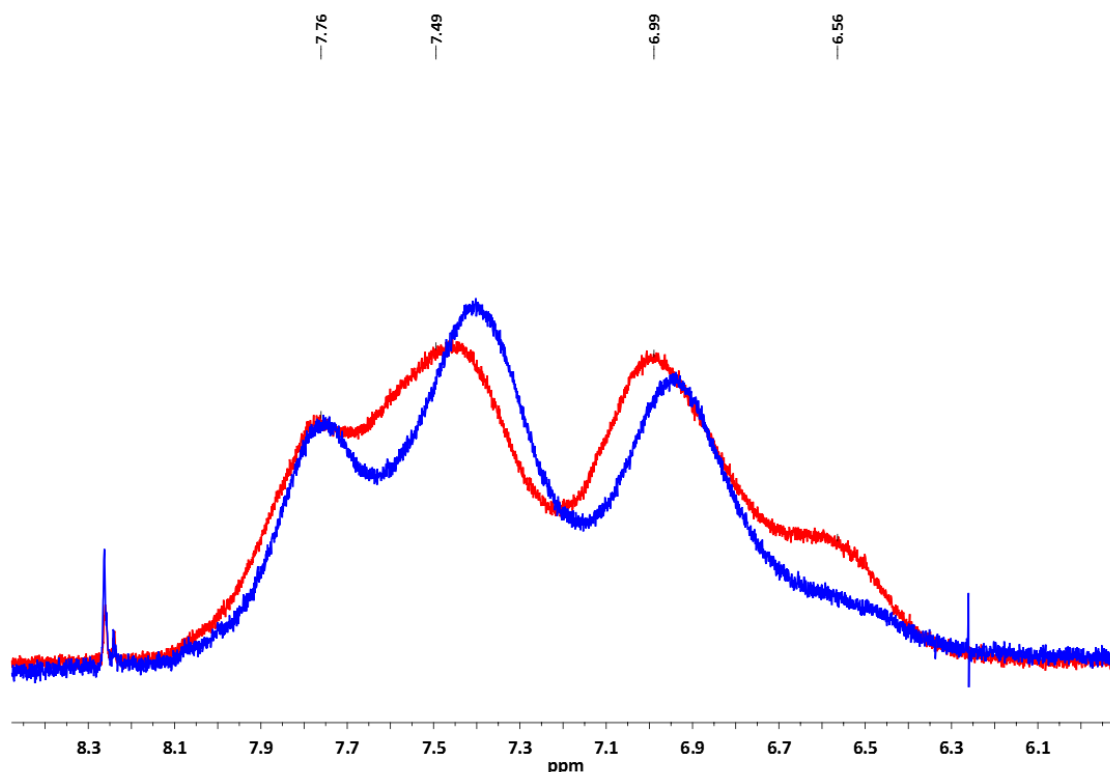


Abbildung 5-35: Überlappende  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Polymers **P[AZEA-DMAA] 6** in  $\text{D}_2\text{O}$ . Das blaue Spektrum zeigt das Polymer vor der Bestrahlung, das rote Spektrum nach Bestrahlung mit UV-Licht.

Mittels UV/Vis-Spektroskopie lässt sich die Isomerisierung von *trans* zu *cis* des Azobenzenebausteines in seiner ungebundenen und auch in polymergebundener Form visualisieren. Eine Aussage über den Isomerisierungsgrad, das *E/Z*-Verhältnis, lässt sich alleine durch die UV/Vis-Spektren nicht treffen, da beide Isomere bei ähnlichen Wellenlängen Licht absorbieren. Eine Aussage über die maximale Isomerisierung durch die Bestrahlung mit UV-Licht lässt sich über den Anstieg der Extinktion für den  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang bei ca. 440 nm treffen. Die, auf diese Weise, maximal isomerisierten Proben lassen sich durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bezüglich des *E/Z*-Verhältnisses untersuchen. Hier zeigte sich, dass die Isomerisierung nicht vollständig verläuft, jedoch ein Großteil des Azobenzens in die *cis*-Form überführt werden konnte; beim ungebundenen wie auch beim gebundenen Baustein. Daneben haben die Konzentration und das Lösemittel einen starken Einfluss auf die Isomerisierungsfähigkeit. Höhere konzentrierte Lösungen bedürfen mehr Energie für die Isomerisierung. Ebenso erfolgt die Isomerisierung in Wasser sehr wahrscheinlich zu geringeren Anteilen als in DMSO. Dieses lässt sich auf die Verhältnisse der Extinktion bei 440 nm, vor und nach der Bestrahlung, zurückführen. Der Isomerisierungsgrad von polymergebundenen AZEA in Wasser ließ sich durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie nicht feststellen, da die Signale in den Spektren nicht differenzierbar waren.

## 5.4 Temperaturschaltung der Polymere

Die wässrigen Lösungen der dargestellten Polyacrylamidpolymere sollen temperaturschaltbar sein. Um dieses zu bestätigen und zu charakterisieren, wurden Trübungsmessungen der Polymerlösungen durchgeführt. In Abhängigkeit der Temperatur wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 650 nm bestimmt und die untere kritische Lösungstemperatur (LCST) durch eine Vierparameterregressionsanalyse berechnet. Sie liegt im Wendepunkt der erzeugten sigmoiden Kurve.

### 5.4.1 P[DMAA-AZAA-NAS]

Einige der P[DMAA-AZAA-NAS] Copolymere wurden hinsichtlich ihres Trübungsverhalten untersucht. Die hydrophobe Azobenzenseitengruppe ist zur Generierung eines temperatursensitiven Verhaltens des PDMAA-Copolymers verwendet worden. In Abhängigkeit des AZAA-Anteiles in der Polymerzusammensetzung sollten die Lösungen verschiedene Trübungstemperaturen aufweisen. Unbekannt war der Einfluss des Aktivesterbausteines NAS.

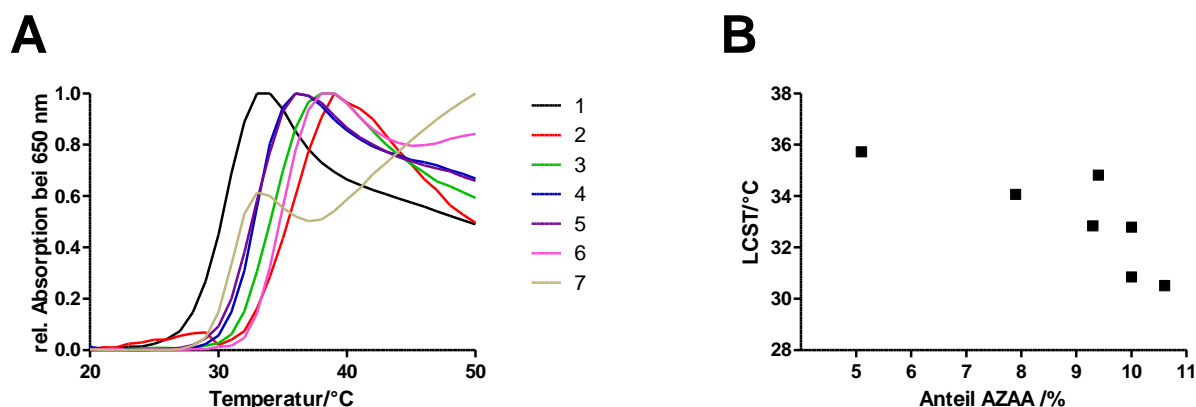


Abbildung 5-36: Bestimmung der LCST-Werte von P[DMAA-NAS-AZAA] 1 – 7. A: Trübungskurven der Lösungen in Abhängigkeit der Lösungstemperatur; B: berechnete LCST-Werte der Polymerlösungen. Bestimmt durch Methode a. Polymerkonzentration 5 mg/mL.

Die Polymerlösungen zeigten – in Abhängigkeit des Anteils an AZAA – Trübungstemperaturen zwischen ca. 36 °C und 30 °C, siehe Abbildung 5-36. Eine lineare Abhängigkeit der Trübungstemperatur und des AZAA-Anteiles konnte auch beobachtet werden. Allerdings konnten diese Werte nur für eine Isomerform der Azobenzengruppe bestimmt werden. Nach der Isomerisierung des Photochromes in der Polymerlösung war eine Bestimmung der LCST nicht mehr möglich. Es bestand der Verdacht, dass der NAS-Baustein durch die Bestrahlung leichter hydrolysiert und dadurch einen stärkeren Einfluss auf den Phasenübergang ausübt. Um dieses zu bestätigen, wurde eine Vergleichsuntersuchung des Monomerbausteines durchgeführt. NAS wurde in Wasser gelöst, anschließend wurde die Lösung unter

---

den gleichen Bedingungen bestrahlt. Die Charakterisierung der Lösung durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie zeigte, dass die Eintragung von kurzwelligem Licht die Hydrolyse des NAS-Bausteins begünstigt. Ebenso ließen sich die LCST-Werte der Polymerlösungen nicht reproduzieren. Hier kam es zur Hydrolyse, da NHS-Ester in Wasser (pH 7) nur eine begrenzte Halbwertszeit von ca. vier bis fünf Stunden besitzen (151). Deshalb wurde auf eine genauere Betrachtung der LCST-Werte von den Aktivesterpolymeren **P[DMAA-NAS-AZAA]** verzichtet. Die LCST-Bestimmung sollte erst nach der Umsetzung mit den Amino-bausteinen gesehen.

Nach der Umsetzung der Aktivesterpolymere mit den Aminoalkylmaleimiden wurden von diesen Polymeren wässrige Lösungen angesetzt (5 mg/mL). Sie wurden hinsichtlich ihres temperatursensitiven Verhalten charakterisiert (LCST-Messung nach Methode B, Methoden und Geräte). Die beiden Polymere **P[DMAA-AZAA-Mal]** **3** und **4**, die mit dem höheren Azobenzanteil, konnten nicht in Wasser gelöst werden. Auch eine geringere Konzentration (1 mg/mL) zeigte keine Verbesserung. Die beiden anderen Polymere **P[DMAA-AZAA-Mal]** **1** und **2**, die mit dem geringeren Anteil an Azobenz, zeigten kein LCST-Verhalten. Da die Polymerzusammensetzung mit ca. 10 % **AZAA** und ca. 10 % des Maleimidbausteines einen hohen Anteil an unpolaren Seitengruppe aufweist, ist das Ausbleiben des Phasenüberganges wahrscheinlich auf eine andere Ursache zurückzuführen, zum Beispiel die geringe Molmasse oder ein nicht vollständig erfolgter Umsatz und die anschließende Hydrolyse des NHS-Seitengruppe.

#### 5.4.2 **P[DMAA-AZEA-NIPAAm]**

Die dargestellten Terpolymere enthielten die Polyalkylacrylamidgruppen PDMAA und PNIPAAm. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit und zur Generierung einer Verschiebung der LCST zwischen der *cis*- in die *trans*-Konfiguration des Azobenzens wurde die Dimethylacrylamidgruppe verwendet. Die Isopropylamidseitengruppe wurde eingeführt, um die Trübungstemperatur in einen biologischen Bereich zu führen, und um die Empfindlichkeit des Polymersystems hinsichtlich der Einbaurate zu verringern. Dieses Polymersystem sollte helfen, Polymere mit Maleimidgruppen aufzubauen und ihr Verhalten besser kontrollieren zu können.

Die LCST-Werte einiger Polymere wurden mit Methode a bestimmt, siehe Methoden und Geräte. Es wurde die Werte in Abhängigkeit der Polymerkonzentration in der Lösung und der Konfigurationen der Azobenzengruppe bestimmt, siehe Tabelle 5-17.

Tabelle 5-17: Gemessene LCST-Werte der Polymerlösungen von **P[DMAA-AZEA-NIPAAm]** in Abhängigkeit der Polymerkonzentration und des Azobenzenisomers. Bestimmt durch Methode a.

Polymer Nr.:	LCST-Werte /°C									
	20 mg·mL <sup>-1</sup>		15 mg·mL <sup>-1</sup>		10 mg·mL <sup>-1</sup>		5 mg·mL <sup>-1</sup>		1 mg·mL <sup>-1</sup>	
	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
3	30.5	32.5	34.5	33.5	51.0	50.0	54.0	57.0	60.5	62.5
4	Nicht messbar		22.5	21.5	42.5	43.0	48.5	47.0	56.0	57.0
5	Nicht messbar		Nicht messbar		22.0	21.0	58.0	56.5	54.0	53.0
6	Nicht messbar		Nicht messbar		14.5	11.5	41.0	39	41.5	42.0

Die Polymerlösungen zeigten ein Schaltverhalten, der Trübungspunkt war stark von der Polymerkonzentration abhängig. Innerhalb einer begrenzten Konzentrationsspanne waren die Polymere schaltbar – zu niedrigen Konzentration führten zu einem Verlust des Kollabierungsverhalten und zu hohen Ansatzkonzentrationen waren nicht mehr löslich. Einen Einfluss der Konfiguration konnte nicht beobachtet werden, meistens wiesen die Polymere mit einen erhöhten Anteil des *cis*-Isomers ähnliche Werte auf; teilweise sogar niedrigere. Um den Einfluss der Seitengruppen der dargestellten Polymere **P[DMAA-AZEA-NIPAAm] 1 – 7** genauer zu betrachten, wurde eine Versuchsreihe bei einer Konzentration von 10 mg/mL angesetzt und mit Methode b überprüft, siehe Abbildung 5-37. Die für die Trübungstemperatur bestimmten Werte der sieben Polymere wurden gegen die prozentualen Anteile einzelner Seitengruppe des jeweiligen Polymers aufgetragen (siehe Abbildung 5-37). Die Polymere zeigten alle ein Trübungsverhalten mit Trübungstemperaturen von 36.8 °C bis 70.0 °C (A). Dieses Werte konnten durch die Gesamtanteile von NIPAAm und AZEA im Polymer beeinflusst werden (B), dabei hatte NIPAAm (C) einen geringen Einfluss auf die LCST als AZEA (D). Mit AZEA lässt sich die LCST leicht erniedrigen, allerdings ist der Konzentrationsbereich der AZEA-Gruppe im Polymer sehr beschränkt. Zu geringe Konzentrationen führen zu hohen Werte oder sogar zum Verlust der LCST; zu hohe Azobenzenkonzentrationen führen zu unlöslichen Polymeren. Außerdem korrelierte die LCST mit der zahlenmittleren Molmasse: höhere Molmassen führten zu niedrigen Trübungspunkten, siehe Abbildung 5-37 E. Die Molmasse korrelierte aber auch mit dem Anteil der Isopropylamidseitengruppe im Polymer (Abbildung 5-37 F).

Die NIPAAm-Seitengruppe ist eine interessante Alternative, um ebenfalls die LCST in PDMAA-Copolymeren zu erniedrigen, allerdings ist ihr Einfluss geringer als der Einfluss des AZEA-Bausteins und ein zu großer Anteil würde die Effekte der Isomerisierung des Azobenzenbausteines reduzieren.

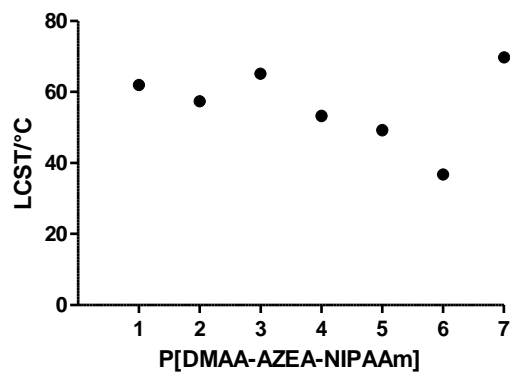
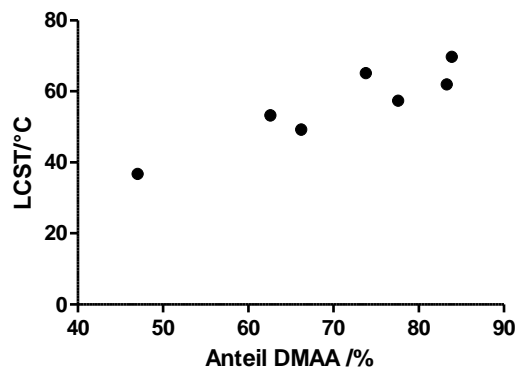
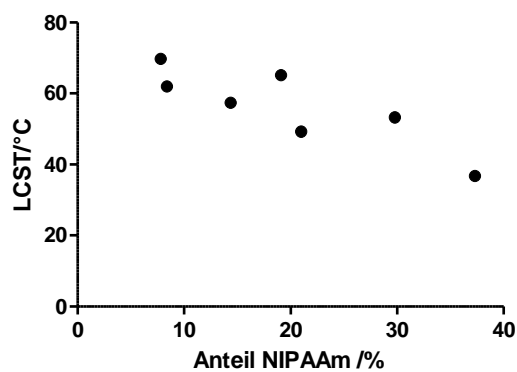
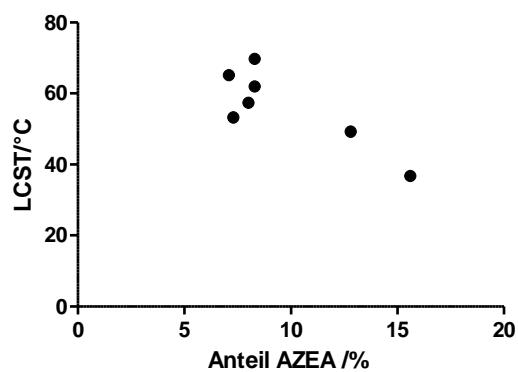
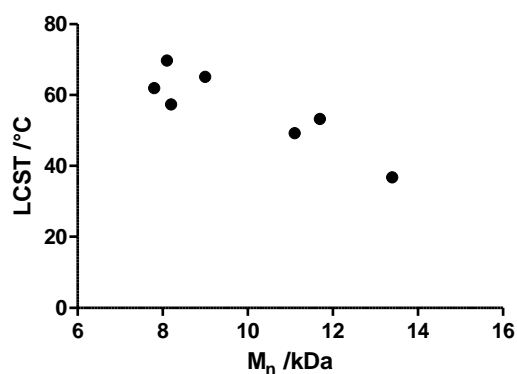
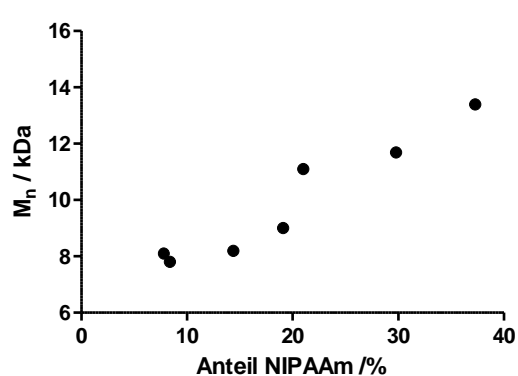
**A****B****C****D****E****F**

Abbildung 5-37: LCST-Werte der Polymere **P[DMAA-AZEA-NIPAAm] 1 – 7** (10 mg/mL, *trans*). (A): Aufgetragen gegen die Polymernummer; (B): gegen den Anteil an DMAA; (C): gegen den Anteil an NIPAAm; (D) gegen den Anteil an AZEA; (E) und gegen die zahlenmittlere Polymermasse ( $M_n$ ). (F) Zeigt die zahlenmittlere Molmasse gegenüber dem Anteil an NIPAAm im Polymer.



---

### 5.4.3 P[DMAA-AZEA-AHMal]

Die Darstellung von P[DMAA-AZEA-AHMal] Copolymeren war ein wichtiges Teilziel. Alle drei Seitengruppen sind für bestimmte Eigenschaften der Polymere verantwortlich. Eine wichtige Fähigkeit dieser Polymergruppe ist ihr temperatursensitives Verhalten. Dieses ist, wie auch bei den vorherigen Polymeren, von verschiedenen Faktoren abhängig. Zu hohe Anteile der eingebauten, unpolaren Gruppe AZEA und AHMal führten zu unlöslichen Polymeren, beispielsweise bei den Polymeren P[DMAA-AZEA-AHMal] 1 – 5. Die biokonjugierbaren, ternären Polymere P[DMAA-AZEA-AHMal] 6 – 11 waren indes wasserlöslich. Sie wurden mit Methode b hinsichtlich ihrer LCST in Abhängigkeit von der Konzentration, der Polymerzusammensetzung und der Konfiguration der Azobenzengruppe untersucht. Außerdem wurden die Lösungen wiederholt thermisch geschaltet, um die Reproduzierbarkeit und eine eventuelle Hysterese zu untersuchen. Dieses wurde durch zyklische Messungen durchgeführt. Dabei wurde die Lösung von 10 °C bis auf 70 °C aufgeheizt und anschließend bis zu einer Temperatur von 10 °C wieder abgekühlt. Dieser Messzyklus wurde zehnmal wiederholt.

#### 5.4.3.1 Einfluss der Konzentration, der Zusammensetzung und des Azobenzenisomers

In der ersten Versuchsreihe wurde die Konzentrationsabhängigkeit der LCST betrachtet (Tabelle 5-18). Es wurden Polymerkonzentrationen zwischen 0.1 % und 1.0 % (m/V) angesetzt, anschließend wurden die Trübungstemperaturen der Lösungen in der *cis* bzw. *trans*-Konfiguration der Azobenzengruppe bestimmt. Bei einer Konzentration von 0.1 % war der Phasenübergang meist nur schwach ausgeprägt. Bei Konzentrationen von 1 % und höher waren die meisten Polymere schlecht bis gar nicht löslich, in diesem Konzentrationsbereich konvergierten die Trübungstemperaturen bei ca. 25 °C. Die Polymere mit den *cis*-konfigurierten Azobenzengruppen wiesen dieselben LCST-Werte auf wie die Polymere mit den *trans*-konfigurierten Azobenzengruppen; oder die Werte waren kleiner.

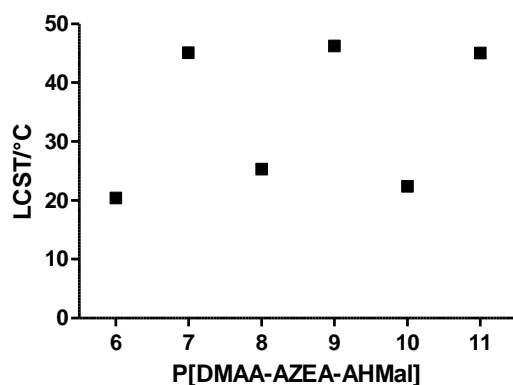
Vergleicht man die Lösungen bei einer Konzentration von 0.5 % in der gleichen Konfiguration (*cis*), so lässt sich der Einfluss der einzelnen Polymerseitengruppen auf die LCST ermitteln (Abbildung 5-38). Auffällig ist hier, dass die Anteile der Azobenzengruppe alleine (Abbildung 5-38 B) oder die der Azobenzengruppe in Kombination mit der Maleimidgruppe (Abbildung 5-38 C) keinen starken Einfluss haben. Der Anteil der AHMal-Gruppe im Polymer scheint die Trübungstemperatur allerdings stark zu beeinflussen.

Tabelle 5-18: LCST-Werte der Polymere **P[DMAA-AZEA-AHMal]** 6 – 11 in °C in Abhängigkeit der Polymerkonzentration und des Azobenzenisomers.

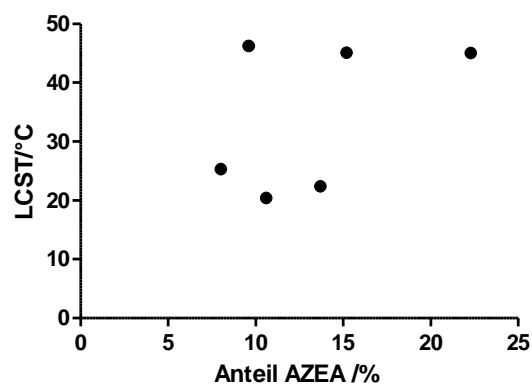
Polymer Nr.:	LCST-Werte / °C					
	10 mg·mL <sup>-1</sup>		5 mg·mL <sup>-1</sup>		1 mg·mL <sup>-1</sup>	
	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>
6	Nicht messbar		n.b.	20.4	n.b.	26.1
7	Nicht messbar		45.1	45.1	44.6	43.6
8	24.9	24.9	32.2	28.4	47.3	37.7
9	n.b.	25.7	47.5	46.2	55.4	55.7
10	Nicht messbar		22.4	22.4	40.5	40.5
11	Nicht messbar		45.8	45.1	44.3	44.2

n.b.: nicht bestimmt

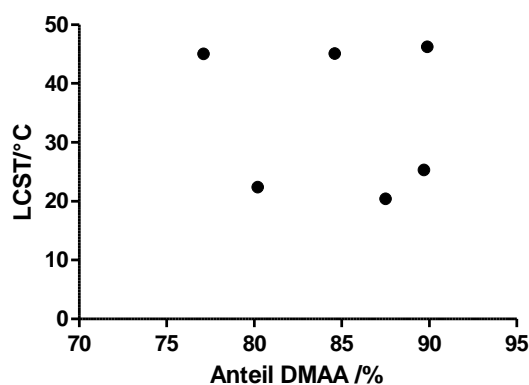
**A**



**B**



**C**



**D**

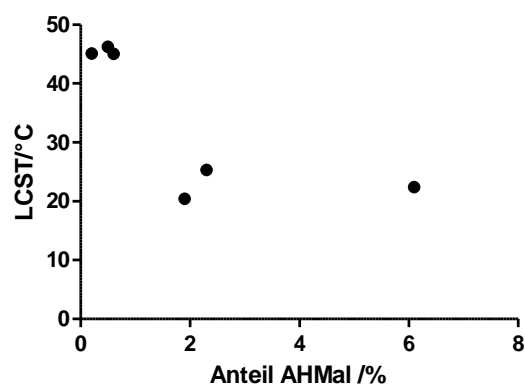


Abbildung 5-38: LCST-Werte der Polymere **P[DMAA-AZEA-AHMal]** 6–11 (0.5 %; m/V). Aufgetragen gegen die Polymernummer (A), dem Anteil an AZEA (B), dem Anteil an DMAA (C) und dem Anteil an AHMal (D).

#### 5.4.3.2 Zyklisches Bestimmung der Trübungstemperatur

**P[DMAA-AZEA-AHMal] 8** (0.5 %) wurde mit Methode b untersucht (Abbildung 5-39), dabei ist eine Erhöhung der kritischen Lösungstemperatur beim wiederholende Schalten der Lösung aufgefallen. Die Temperatur stieg von 28.4 °C bis 48.9 °C (Abbildung 5-39 A). Dieses Phänomen wurde anschließend näher untersucht. Um Abbau- oder Zersetzungsreaktionen ausschließen zu können, wurde das Polymer nach der thermischen Schaltung charakterisiert und später erneut thermisch geschaltet. Des Weiteren wurde die Azobenzengruppe und ihre Konfiguration beachtet, sowie verschiedene Bedingungen für das thermische Schalten.

Nach dem ersten Zyklus (Abbildung 5-39 A) wurde die Lösung lyophilisiert, im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum charakterisiert (Abbildung 5-40), das Chloroform wurde wieder entfernt, der Rückstand wurde erneut in Wasser gelöst und erneut thermisch geschaltet (Abbildung 5-39 B). Dieses wurde noch zweimal durchgeführt (Abbildung 5-39 C + D). Des Weiteren wurde dies für eine neue angesetzte Lösung in der *trans*-Konfiguration ebenfalls durchgeführt (Abbildung 5-39 E). Die bestimmten Temperaturen sind in (Abbildung 5-39 F) aufgetragen.

Bei allen Versuchen kommt es während der zyklischen Messungen zu einer Verschiebung der Trübungstemperatur hin zu höheren Werten. Insbesondere bei den ersten beiden Messungen in der *cis*-Konfiguration und der Messung in der *trans*-Konfiguration ist der Unterschied sehr groß. Hier beträgt die Differenz zwischen der ersten und letzten Messung 12.8 °C, 16.8 °C bzw. 20.5 °C (Abbildung 5-39 A, B, E). Vergleicht man die Ergebnisse der ersten 20 Messungen (zehn Zyklen) in der *trans*- sowie in der *cis*-Konfiguration (Abbildung 5-39 F), so fällt auf, dass die bestimmten Werte sich annähern. Nach einer Anfangsdifferenz von ca. 4 °C (*cis* 28.4 °C; *trans* 32.2 °C) werden nach der sechsten Messung sehr ähnliche Werte bestimmt. Dieses geht einher mit der thermischen Relaxation der Azobenzengruppe vgl. Abbildung 5-39 G.

Um eine Hydrolyse der Maleimidgruppe oder des Azobenzenbausteines, als Ursache für die Verschiebung der Trübungstemperatur ausschließen zu können, wurden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Polymere nach dem Schaltvorgang aufgenommen. Die Spektren wurden übereinander gelegt, zur Kalibrierung wurden die Signalhöhen der Spektren angepasst, dabei wurde das Signal bei 7.50 ppm als Referenz gesetzt.

Insbesondere die weiteren Signale der Aromaten bei 8.30 – 7.30 ppm und die der Maleimidgruppe bei 6.60 ppm wurden betrachtet und mit denen anderen Signalen verglichen. Ein Hydrolyse der Maleimidgruppe oder ein Verlust der Aromaten konnten nicht festgestellt werden. Das Signal für die amidische Protonen bei 6.80 ppm nahm innerhalb der Versuchsreihe ab, dieses lässt sich durch den Austausch der Protonen erklären. Auch die Signale des Polymerrückrates, des Alkyllinkers und der Methylgruppen haben sich nur geringfügig verändert. Auffällig ist das Signal bei 2.50 ppm im ersten Spektrum, dieses trat nur in diesem Spektrum auf und konnte nicht zugeordnet werden.

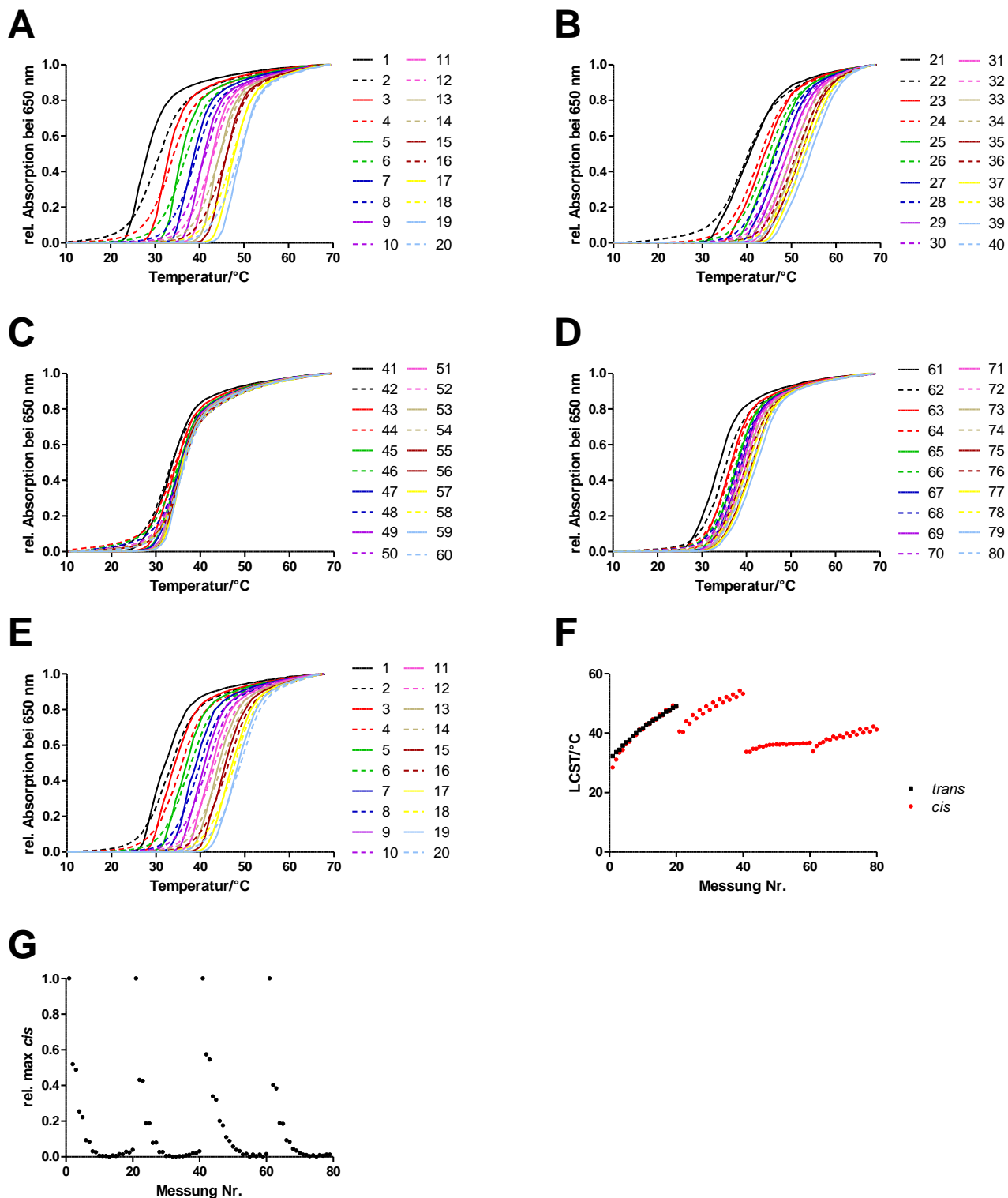


Abbildung 5-39: LCST-Messungen von P[DMAA-AZEA-AHMal] 8 (5 mg/mL). A – D: Absorptionsmessungen der vier Zyklen. E: Absorptionsmessungen in der *trans*-Konfiguration; F: LCST-Werte der einzelnen Messungen; G: Anteil der maximalen *cis*-Konfiguration, bestimmt durch die Absorption für den  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang bei 440 nm, bezogen auf die Absorption nach der Isomerisierung mit Blaulicht ( $\lambda=460$  nm). Messung Nr. 1 – 20: 1. Zyklus; 21 – 40: 2. Zyklus; 31 – 60: 3. Zyklus; 61 – 80: 4. Zyklus.

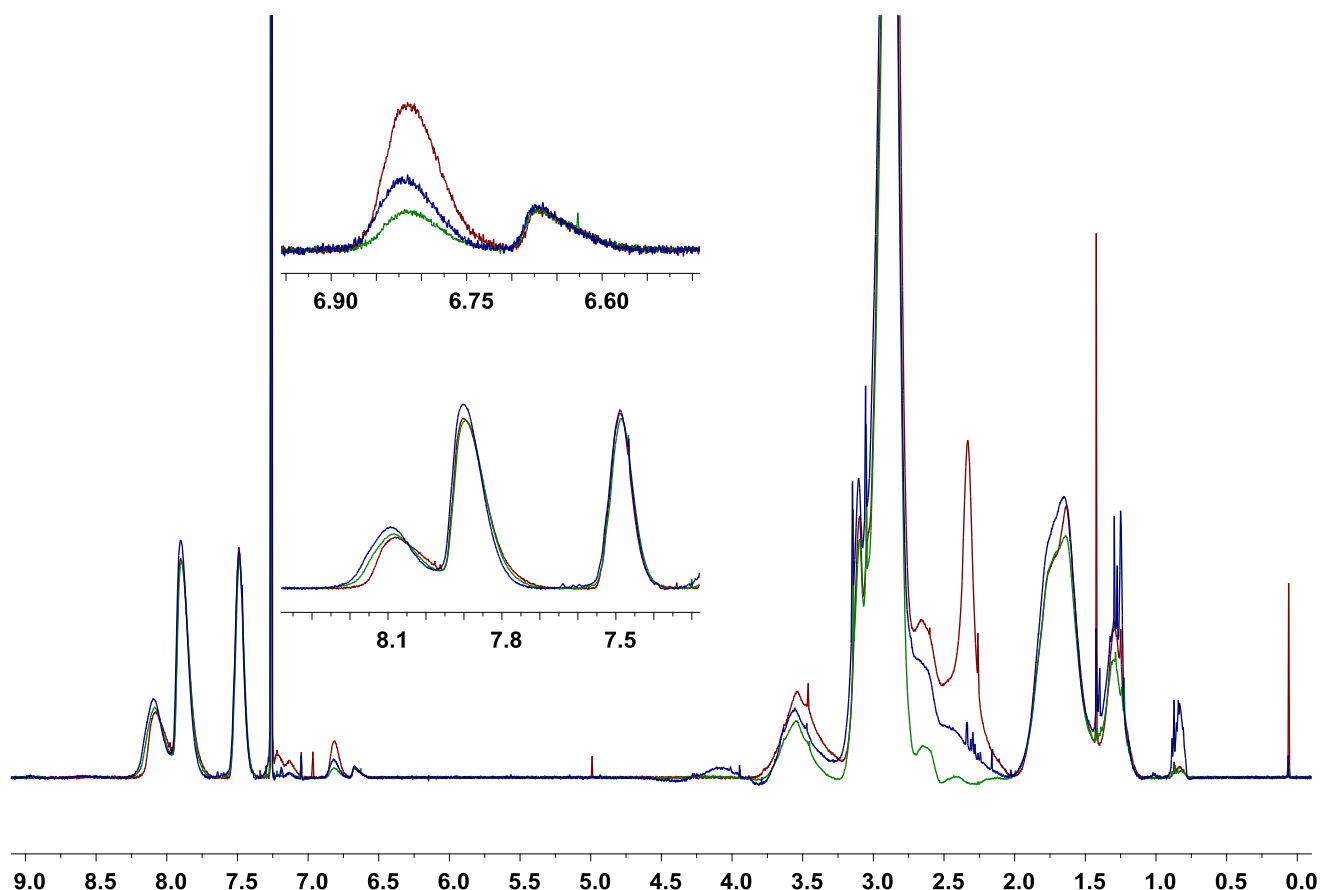


Abbildung 5-40:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Polymers **P[DMAA-AZEA-AHMal] 8** vor der Schaltung (rot), nach dem ersten Zyklus (grün) und nach dem zweiten Zyklus (blau). Die Spektren sind auf die Azobenzenseitengruppe normiert 8.30 – 7.30 ppm.

Da keine Zersetzung des Polymers beobachtet wurde und die Hysterese sowohl in der *cis*- als auch in der *trans*-Konfiguration aufgetreten ist, außerdem auch beim erneuten Auflösen des Polymers die Temperaturverschiebung beobachtet wurde, wurden nun die Bedingungen genauer betrachtet. Hierfür wurden 0.5 %ige Lösungen von **P[DMAA-AZEA-AHMal] 4** angesetzt und diese unter verschiedenen Bedingungen thermisch geschaltet. Die Zeit und die Temperatur vor dem Start der Messungen wurden variiert, sowie die Heizrate während des Messprozesses. Außerdem wurde zu einer Lösung eine geringe Menge des Tensids Triton X zugesetzt. Alle Variationen hatten das Ziel, mögliche Polymer-Polymer-Interaktionen vor der Trübungspunktbestimmung zu unterdrücken, und somit die LCST bestimmen zu können, ohne eine Verschiebung der Ergebnisse zu höheren Temperaturen zu bekommen.

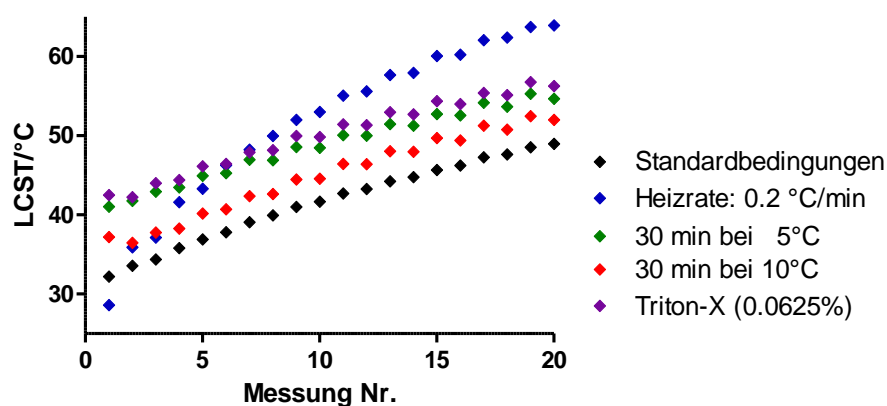


Abbildung 5-41: LCST-Werte von **P[DMAA-AZEA-AHMal] 4** Polymerlösungen (5 mg/mL; *trans*) bei verschiedenen Bedingungen.

In Abbildung 5-41 sind die bestimmten Trübungstemperaturen für die 20 Messungen aufgetragen. Als Referenz wurden die Werte aus der Bestimmung mit den Standardbedingungen (Starttemperatur: 10 °C; Endtemperatur: 70 °C, Heiz-bzw. Abkühlrate: 1 °C/min; vor Beginn der Aufheizphase wurde die Starttemperatur für 5 min gehalten; vor Beginn der Abkühlphase wurde die Lösung 2 min bei der Endtemperatur gehalten) ebenfalls aufgetragen. Bei allen Variationen ist es dennoch zu einer Verschiebung der ermittelten Trübungstemperatur gekommen. Die stärkste Verschiebung trat bei der fünffach langsameren Heizgeschwindigkeit auf. Hier beträgt die Differenz zwischen der ersten Messung und der letzten Messung 35.3 °C. Die geringsten Differenzen wurden bei den Messungen in einer Triton-X Lösung (0.0625 %) und mit einer längeren Äquilibrierung bei 5 °C erhalten. Die bestimmten LCST-Werte der letzten Messung (jeweils Nr. 20) lagen alle – mit Ausnahme der Messung mit der langsamen Heizrate – bei 52.0 °C – 56.3 °C. Diese Ergebnisse deuten auf Polymer-Polymer-Interaktionen hin. Denkbar wäre die Bildung von nichtkovalenten Bindungen der Polymere untereinander. Nach mehrmaligen Aufheizen und Abkühlen der Lösung werden diese minimiert, das Polymer verringert dabei seine relative Größe und die Trübungstemperatur steigt. Dieses deckt sich auch mit den Ergebnissen in der Triton-X Lösung und bei längerer Äquilibrierzeit. Beides sind Variationen, bei denen die Polymer-Polymer-Interaktionen minimiert werden sollten.

#### 5.4.4 P[DMAA-AZEA]

Um ein besseres Verständnis der Polymere zu erhalten und um den Einfluss des wiederholenden Schaltens auf die LCST der Polymere zu untersuchen, wurden Copolymere mit DMAA und AZEA Seitengruppen dargestellt (Kapitel 5.2.2.6). Auf den proteinbindenden Maleimidbaustein **4c** wurde verzichtet, um Effekte ausschließen zu können, die eventuell durch diesen entstanden sind. Die Synthese der Polymere erfolgte entweder in eine Stufe (P[DMAA-AZEA] **1** – **5**, Variante 1) oder über zwei Stufen (P[DMAA-AZEA] **6** – **8**, Variante 2).

##### 5.4.4.1 Variante 1 – P[DMAA-AZEA] 1 bis 5

Die beiden Polymere P[DMAA-AZEA] **1** und **2** zeigten kein Schaltverhalten im untersuchten Temperaturbereich. Die Konzentrationen des Azobenzenebausteines waren mit 7.1 % und 5.5 % niedrig, hätten aber für ein temperatursensitives Verhalten genügen können. Interessant ist, dass durch das Ansäuern der Lösung (pH 1) P[DMAA-AZEA] **2** schaltbar gemacht werden konnte (siehe Abbildung 5-42). Dabei zeigte die Lösung zwei Phasenübergänge, bei 31.2 °C und bei 57.2 °C. Für den Abkühlungsvorgang konnte kein Wert bestimmt werden, da dieser nicht kohärent verlief. Dieses pH-sensitives Verhalten könnte durch eine protonierbare Gruppe entstanden sein. Denkbar wäre, dass der Aktivester nicht vollständig mit dem Dimethylamin abreagiert hat und anschließend, während der Dialyse, hydrolysiert ist. Die dabei teilweise entstandene Polyacrylatgruppe liegt, abhängig vom pH-Wert, protoniert oder deprotoniert vor und könnten somit einen Einfluss auf die LCST besitzen.

P[DMAA-AZEA] **4** und **5** ließen sich nicht vollständig in Wasser lösen, Konzentrationserniedrigungen bis zu 0.1 % führten ebenfalls nicht zum vollständigen Lösen des Polymers.

P[DMAA-AZEA] **3**, mit einem Azobenzeneanteil von 10.0 %, konnte gelöst und geschaltet werden (Abbildung 5-43). Die Temperaturschaltung erfolgte in der *trans*- und in der *cis*-Konfiguration der Azobenzengruppe. Die Trübungstemperatur in der *trans*-Konfiguration lag zwischen 50.8 °C und 56.8 °C, in der *cis*-Konfiguration bei 47.2 °C und 56.3 °C. Der bestimmte Wert in der *cis*-Konfiguration war somit immer niedriger als für die *trans*-Konfiguration (Abbildung 5-43 C). Da für den Messvorgang die Lösung bis auf 70 °C erwärmt wurde, kam es zur thermischen Relaxation der Azobenzengruppe, dieses ist erkennbar durch die Absorptionsänderung für den  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang bei 440 nm. Die maximale Absorption, und somit der größte Anteil an *cis*-Isomer, wurde für die Messung nach der Bestrahlung erzielt (Abbildung 5-43 D). Anschließend nimmt der Anteil weiter ab, ab Messung Nr. 6 ist er vernachlässigbar. Bis zur Messung Nr. 6 sind auch noch Differenzen zwischen den LCST-Werten für die *trans*- und für die *cis*-Konfiguration bestimmbar, anschließend sind sie vernachlässigbar. Weiterhin ist auch hier eine leichte Verschiebung zu höheren Temperaturen nach mehreren Messungen zu beobachten, so beträgt die Differenz in der *trans*-Konfiguration zwischen Messung Nr. 1 und Nr. 20 ungefähr 6 °C.

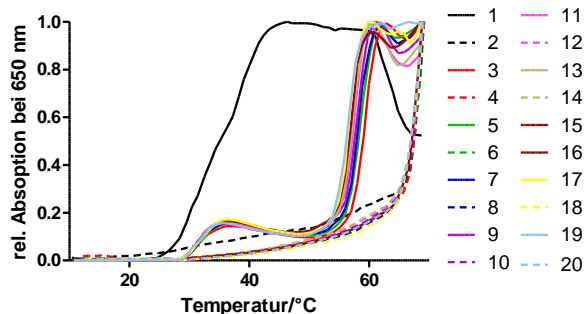
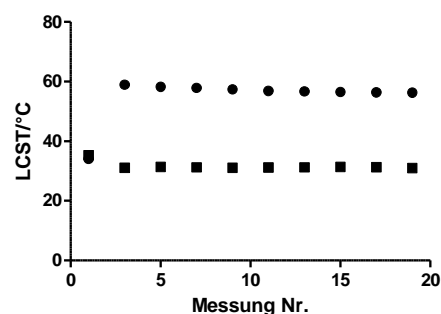
**A****B**

Abbildung 5-42: LCST-Bestimmung von **P[DMAA-AZEA] 2** bei pH 1. A: Trübungskurven der 0.5 %igen Lösung, gestrichelte Linien sind Abkühlungskurven; B: bestimmte LCST-Werte der Phasenübergänge der Aufheizphase, Quadrate: 1. Übergang; Kreise 2. Übergang. Die LCST-Werte der Abkühlungsphase konnten nicht bestimmt werden.

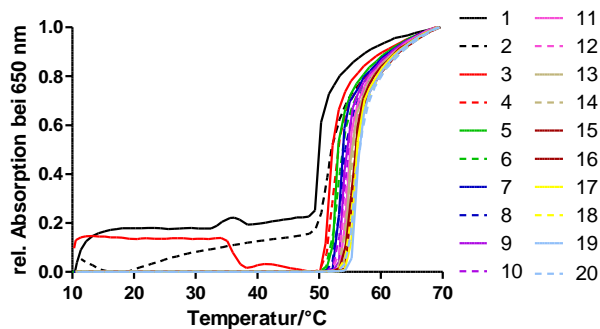
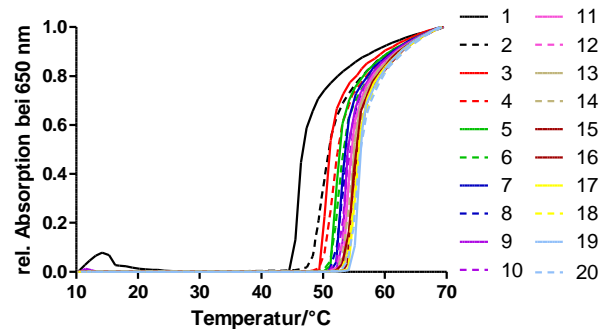
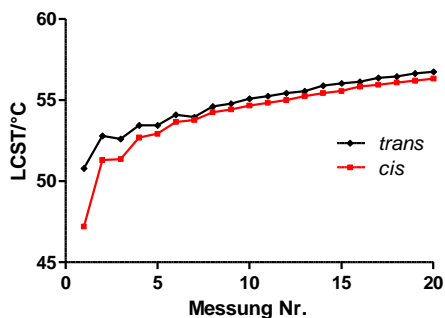
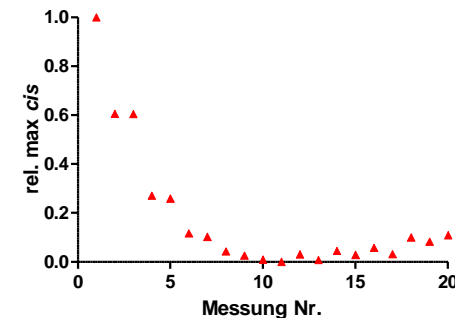
**A****B****C****D**

Abbildung 5-43: LCST-Bestimmung von **P[DMAA-AZEA] 3**. A: Trübungskurven einer 0.5 %igen Lösung in *trans*- bzw. *cis*-Konfiguration (B), gestrichelte Linien sind Abkühlungskurven; C: bestimmte LCST-Werte für die Polymere vor (*trans*) und nach der Bestrahlung (*cis*); D: Anteil der maximalen *cis*-Konfiguration, bestimmt durch die Absorption für den  $n \rightarrow \pi^*$  Übergang bei 440 nm und bezogen auf die Absorption nach der Isomerisierung durch Bestrahlung.



#### 5.4.4.2 Variante 2 – P[DMAA-AZEA] 6 bis 8

Von den Polymeren **P[DMAA-AZEA] 6 – 8** wurden nur die finalen Polymere hinsichtlich ihres Schaltverhaltens charakterisiert, die Zwischenstufen wurden nicht betrachtet. Für **P[DMAA-AZEA] 6** wurden Werte zwischen 36.5 °C – 50.2 °C für eine 0.5 %-Lösung in der *trans*-Konfiguration und Werte zwischen 34.6 °C – 51.1 °C in der *cis*-Konfiguration bestimmt. Die Werte für den Phasenübergang nahmen mit jeder Messung zu und endeten nahezu in einem Plateau bei ca. 51 °C. Ein Unterschied zwischen den Konfigurationen der Azobenzengruppe konnte bei der ersten Messung bestimmt werden. Hier war die LCST für das Polymer mit den Azobenzengruppen in der *cis*-Konfiguration ca. 2 °C geringer (Abbildung 5-44, D). In einem weiteren Versuch (*trans* Nr. 2) konnte durch eine längere Äquilibration der Lösung bei 70 °C die Verschiebung der LCST verringert werden. Hier betrug die LCST ca. 55 °C.

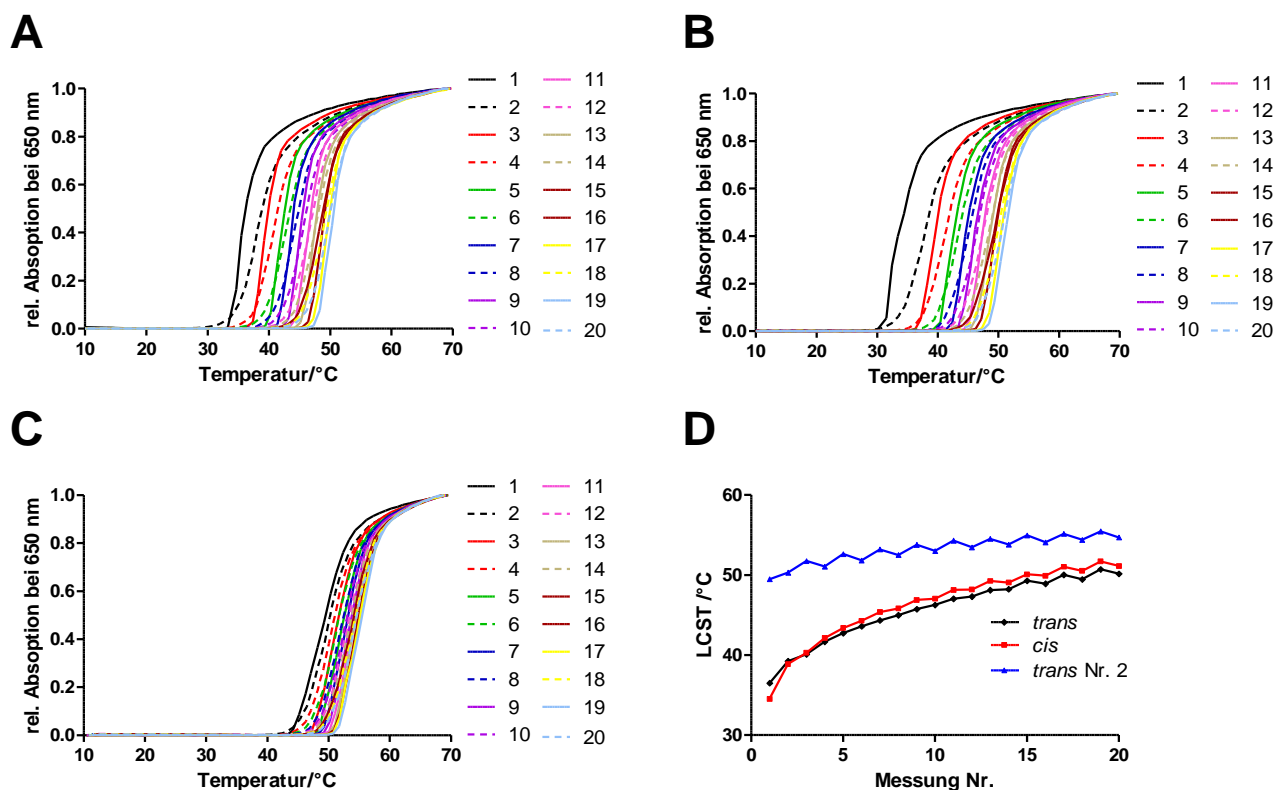


Abbildung 5-44: LCST-Messung von **P[AZEA-DMAA] 6**. Trübungskurven einer 0.5 %igen Lösung von in *trans* (A) bzw. (B) *cis*-Konfiguration, gestrichelte Linien sind Abkühlungskurven; C: Trübungskurven der Lösung in *trans*-Konfiguration (*trans* Nr. 2, längere Äquilibrierzeit bei 70 °C); D: berechnete LCST-Werte der *cis*- und der *trans*-Konfiguration der Diagramme A – C.

Für **P[DMAA-AZEA] 7** wurden nur geringe LCST-Erhöhen während der Versuchsreihen festgestellt, auch die Verlängerung der Äquilibrierzeit hatte keinen entscheidenden Einfluss. Alle Werte lagen zwischen 59.8 °C und 62.7 °C (5 mg/mL) bzw. 52.0 °C und 56.1 °C (10 mg/mL), siehe Abbildung 5-45. Lediglich die erste Messung in der *cis*-Konfiguration der einprozentigen Lösung wich ab. Sie war

mit 50.8 °C ca. 3 °C niedriger als die übrigen Temperaturen der gleichen Messungreihe. Dies könnte mit der Photoschaltung korrelieren, da hier der *cis*-Anteil noch maximal war, während bei den nachfolgenden Messungen der Reihe der *trans*-Anteil durch die thermische Relaxation zunimmt.

Für **P[DMAA-AZEA] 8** (0.5 %) konnte keine LCST bestimmt werden. Angesetzte Lösungen dieses Polymers waren immer getrübt. Ein Phasenübergang konnte bei diesen Lösungen nicht identifiziert werden.

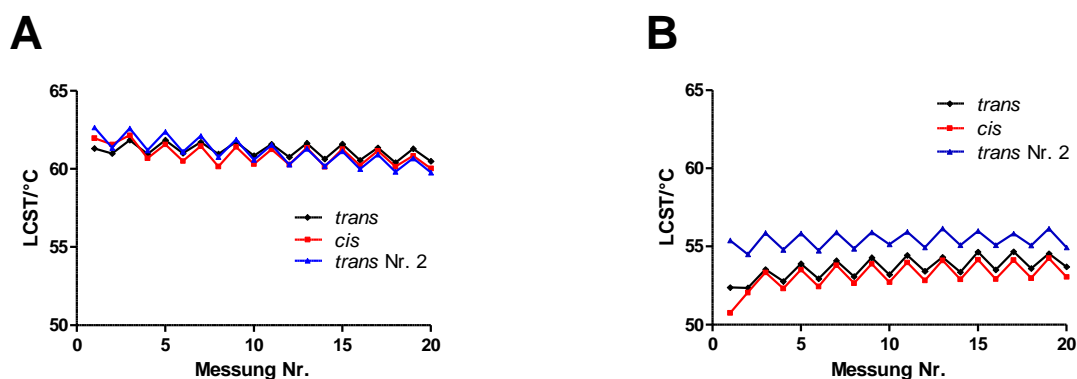


Abbildung 5-45: LCST-Messung von **P[AZEA-DMAA] 7**, bestimmte Trübungstemperaturen für die *trans*- und *cis*-Konfiguration und bei längeren Äquilibrationzeit bei 70 °C (*trans* Nr.2). A: Temperaturen für die 0.5%ige-Lösung; B: Temperaturen für die 1.0%ige-Lösung.

Es konnten Trübungstemperaturen für die **P[DMAA-AZEA]** Polymere bestimmt werden. Die Polymere aus der Synthesevariante 1 zeigten häufig kein Trübungsverhalten, oder sie ließen sich nicht lösen. Beides deutet auf einen unvollständigen, beziehungsweise schwer kontrollierbaren Einbau der Azobenzengruppe hin. Lediglich ein Polymer zeigte ein temperatursensitives Verhalten mit einer LCST von 50 °C – 55 °C. Die Polymere aus der Synthesevariante 2 waren durch Temperaturerhöhung schaltbar. **P[DMAA-AZEA] 8** ließ sich vermutlich aufgrund seines hohen Azobenzenteiles (18.5 %) jedoch nicht lösen. Die Differenz der LCST zwischen den Polymeren mit dem *cis*-Isomer und denen mit dem *trans*-Isomer des Azobenzens war gering. Die größte Differenz war 3.6 °C (**P[DMAA-AZEA] 3**), allerdings wurde die niedrigere Temperatur mit dem *cis*-Isomer des Azobenzens erzielt. Der Drift der LCST zu höheren Temperaturen wurde auch bei dieser Polymerklasse beobachtet, sodass der AHMal-Baustein als Ursache dafür ausgeschlossen werden konnte.

### 5.4.5 Polymere ohne Azobenzengruppen

Durch Umsetzung der Aktivesterpolymere mit anderen Aminobausteinen als dem Azobenzebaustein **15** konnten weitere Polyacrylamidpolymere hergestellt werden. Um Erkenntnisse über den Einfluss der Messmethode und der AHMal-Gruppe auf die LCST zu bekommen, wurde in Abhängigkeit der Temperatur ihr Verhalten in Lösung untersucht.

#### 5.4.5.1 P[DMAA-AHMal]

Lösungen von Polydimethylacrylat (PDMAA) zeigen im Temperaturbereich von 10 °C bis 70 °C kein temperatursensitives Verhalten. Bei Copolymeren mit unpolaren Seitengruppen ist dieses jedoch möglich. Das dargestellte **P[DMAA-AHMal]** (siehe Kapitel 5.2.2.7) besteht, neben dem Hauptpolymer Polydimethylacrylat, aus Hexylmaleimidacrylatseitengruppen. Der verwendete Alkyllinker ist hydrophob, somit könnte er einen Einfluss auf den Trübungspunkt des Polymers haben. Um dieses zu charakterisieren, wurden von den dargestellten Polymeren **P[DMAA-AHMal] 1** und **2** wässrige Lösungen (0.5 %) angesetzt und diese hinsichtlich ihrer LCST untersucht. **P[DMAA-AHMal] 1** zeigte kein responsives Verhalten – hier betrug der Anteil des Aminoethylmaleimidbausteines lediglich 1.7 %. Die Polymerlösungen von **P[DMAA-AHMal] 2** reagierten auf die Temperaturerhöhung, siehe Abbildung 5-46. Die Lösungen zeigten allerdings ein ausgeprägtes Hystereseverhalten: Die Kollabierung erfolgte kohärent mit der Temperaturerhöhung, hierbei wurde Temperaturen von 24.5 °C bis 48.0 °C für die LCST ermittelt. Die nachfolgende Abkühlung hingegen induzierte eine langsame Auflösung des ausgefallenen Polymers, somit ließen sich hier keine Werte für den Trübungspunkt bei dem Rückprozess ermitteln. Auffallend ist, dass die LCST-Werte erst abnehmen und ab der neunten Messung wieder ansteigen. Nach dem Schaltzykluszyklus war ausgefallenes Polymer in der gemessene Lösung zu erkennen, dieses konnte nicht wieder in Wasser aufgelöst werden. Auch nach dem Lyophilisieren der Probe war das Lösen in diversen Lösemitteln, wie Dimethylsulfoxid, Chloroform, Methanol und Tetrahydrofuran nicht möglich, sodass keine Struktursicherung durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie durchgeführt werden konnten. Das nicht reversible Ausfallen war der Grund für die Erhöhung der LCST ab der neunten Messung. Das ausgefallene Polymer wurde der Lösung entzogen und die noch nicht ausgefallenen, kürzerkettigen Polymere und die daraus resultierende Erniedrigung der Polymerkonzentration, führten anschließend zu der Erhöhung der LCST. Dieser Versuch wurde wiederholt (Abbildung 5-46 C+D), dabei wurde die Lösung nur zwischen 10 °C und 40 °C aufgeheizt und abgekühlt, hier konnten Werte zwischen 27.3 °C und 28.3 °C (28.0 ± 0.4 °C) bestimmt werden.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass das Ausfallen des Polymers im ersten Versuch mit der höheren Lösungstemperatur zusammenhängt. Denkbar wäre ein Quervernetzen der Maleimidgruppen, dies würde zu sehr großen Makromolekülen führen, die dann nicht mehr löslich wären. Bekannt ist, dass Maleimide Homopolymerisationen durchführen können, dafür wird für gewöhnlich ein Startmolekül

benötigt (152–154). Wenn die höhere Temperatur allerdings zu einer Hydrolyse führt, könnte das hydrolysierte Maleimid die Homopolymerisation initiieren. Bei der Messung im Temperaturbereich von 10 °C bis 40 °C blieb die Hydrolyse aus und die Messung lieferte für den Phasenübergang der Aufheizphase reproduzierbare Ergebnisse.

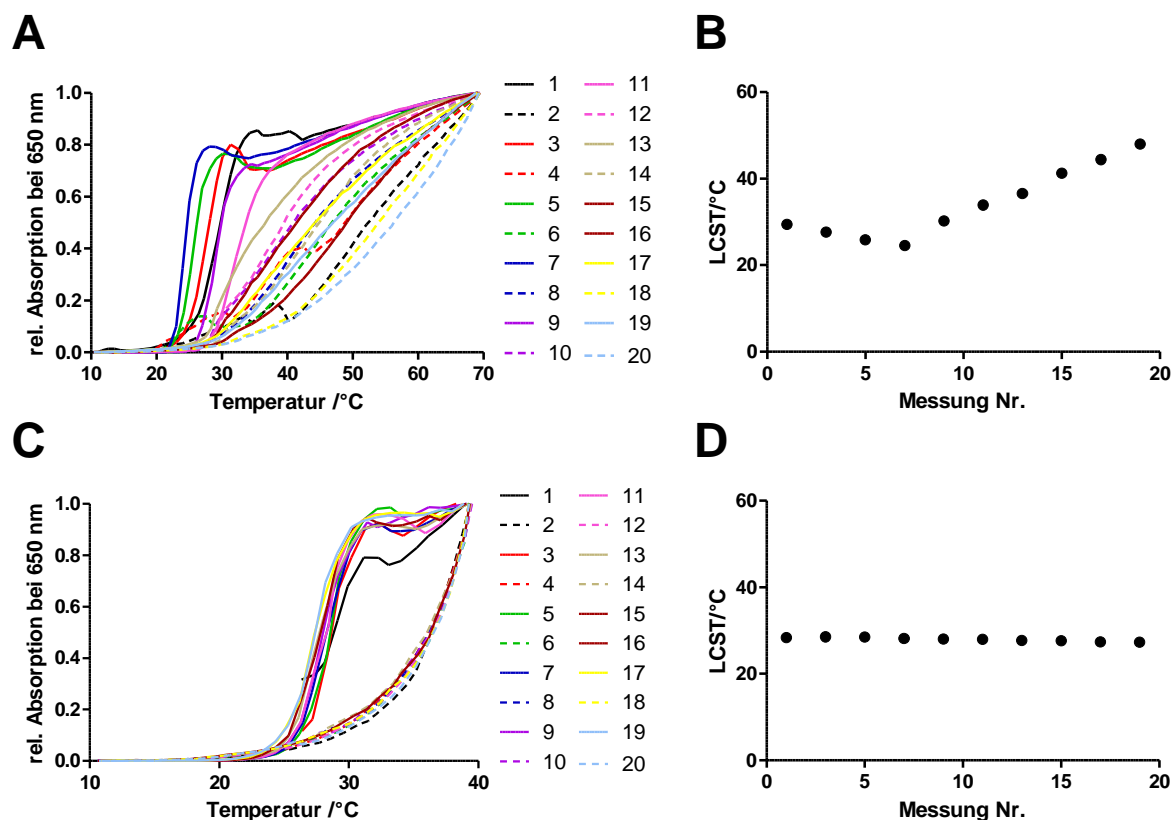


Abbildung 5-46: LCST-Messung von P[DMAA-AHMal] 2 (5 mg/mL). Die Messung für Diagramm A und B wurde im Temperaturbereich von 10 °C bis 70 °C durchgeführt, für C und D im Bereich von 10 °C bis 40 °C. A: Absorptionskurven der Messungen 1 – 20; B: berechnete LCST-Werte. C: Absorptionskurven der Messungen 1 – 20; D: berechnete LCST-Werte. Für die Abkühlphasen konnten keine LCST-Werte bestimmt werden.

### 5.4.5.2 PNIPAAm

Poly(*N*-Isopropylacrylamid) ist das bekannteste temperaturschaltbare Polymer, seine LCST wird meist mit ca. 32 °C angegeben. Es wurde deshalb als Referenzmolekül verwendet, um die Effekte der Temperaturschaltungsmethode und der polymeranalogen Umsetzung zu beobachten. **PNIPAAm 1** wurde, wie unter 5.2.2.7 beschrieben, durch polymeranaloge Umsetzung von **PPFPA** mit Isopropylamin hergestellt. Des Weiteren wurde für diesen Vergleich **PNIPAAm 2** verwendet, das Polymer wurde durch freie radikalische Polymerisation dargestellt. Beide Polymerlösungen zeigten das gewünschte Schaltverhalten (Abbildung 5-47), die bestimmte LCST liegt nahe dem Literaturwert. Für **PNIPAAm 1** wurde ein leicht erhöhter Wert (34.6 °C) bestimmt. Das Hystereseverhalten – die Differenz der LCST zwischen Hin- und Rückprozess – ist bei beiden Lösungen nur schwach ausgeprägt. Eine LCST-Verschiebung, zu höheren Temperaturen beim wiederholenden Schalten der Lösung, konnte nicht beobachtet werden. Somit konnte die Messmethode und die polymeranaloge Umsetzung an **PPFPA** als Ursache für die LCST-Verschiebung bei den **P[DMAA-AZEA-AHMal]** Polymeren ausgeschlossen werden.

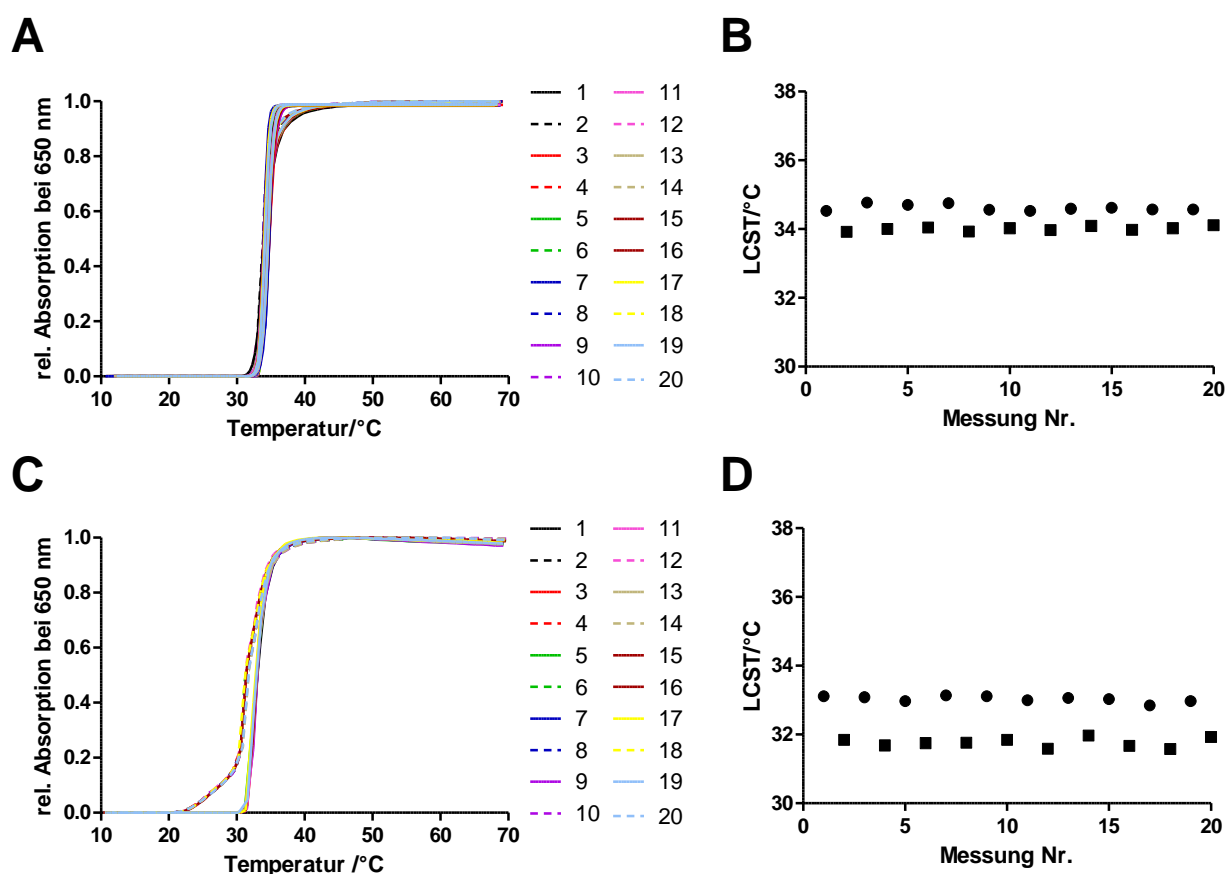


Abbildung 5-47: LCST-Bestimmung von **PNIPAAm** (5 mg/mL). A+B: (**PNIPAAm 1**), C+D (**PNIPAAm 2**). A: Trübungskurven der einzelnen Messungen; B: berechnete LCST-Werte der einzelnen Messungen, Kreise: Aufheizphase, Quadrate: Abkühlphase. Die LCST beträgt  $34.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$  für die Aufheizphase und  $34.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  für die Abkühlphase. C: Trübungskurven der einzelnen Messungen; D: berechnete LCST-Werte der einzelnen Messungen, Kreise: Aufheizphase, Quadrate: Abkühlphase. Die LCST beträgt  $33.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  für die Aufheizphase und  $31.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$  für die Abkühlphase.

### 5.4.5.3 P[NIPAAm-AHSAHA]

Um die Machbarkeit von nichtkovalente Polymer-Protein-Bindungen mit stimulussensitiven Polymeren zeigen zu können, wurde ein Polymer mit einen Inhibitor für Histondeacetylasen (SAHA) dargestellt. Die Synthese erfolgte ebenfalls durch polymeranaloge Umsetzung, siehe Kap. 5.2.2.7. Durch die Verwendung von Isopropylamin als weiteren Aminobaustein entstand ein PNIPAAm-Copolymer, welches hinsichtlich seines Temperaturschaltverhaltens untersucht wurde, Abbildung 5-48.

Die LCST für die 0.5%ige Lösung wurde mit  $37.1 \pm 0.4$  °C für die Aufheizphase und mit  $34.3 \pm 0.4$  °C für den Rückprozess bestimmt.

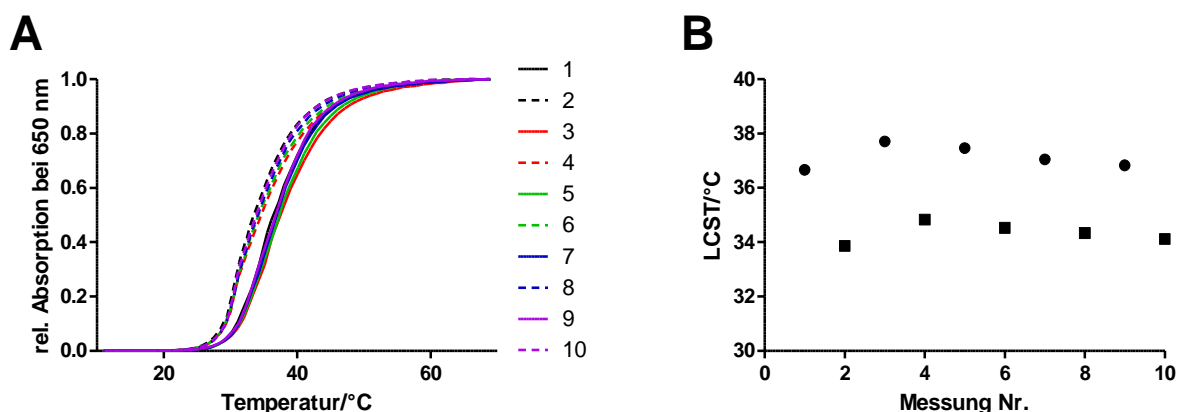


Abbildung 5-48: LCST-Bestimmung einer 0.5 %igen Lösung von **P[NIPAAm-AHSAHA]**. A: Trübungskurven, durchgehenden Linien: 10 °C – 70 °C, gestrichelte Linien: 70 °C – 10 °C; B: bestimmte LCST-Werte der einzelnen Messungen, Kreise: Aufheizphase, Quadrate: Abkühlphase.

Das charakterisierte Polymer zeigte die gewünschte temperatursensitive Eigenschaft. **P[NIPAAm-AHSAHA]** reagierte ungeachtet seiner Hydroxamatfunktion auf die Temperaturveränderung. Der bestimmte Wert für den Trübungspunkt liegt nahe dem von PNIPAAm, der Hauptkomponente des Polymers. Die leichte Erhöhung der Trübungstemperatur könnte von der polaren Hydroxamsäurefunktion generiert worden sein.

Auch ohne Azobenzengruppen konnten temperaturschaltbare Polymere durch polymeranaloge Umsetzung hergestellt werden. Die **PNIPAAm** Varianten **1** und **2** waren beide gleichermaßen temperaturschaltbar, ein auffallender Unterschied zwischen den Darstellungsmethoden konnte hierbei nicht erkannt werden. Ebenfalls waren die Werte über den gesamten Messzyklus stabil, sodass die Messmethode als Ursache für die Temperaturverschiebung bei den anderen Polymeren ausgeschlossen werden konnte. **P[DMAA-AHMal]** war ebenfalls schaltbar. Auch hier kam es nicht zu der LCST-Erhöhung, sodass die AHMal-Seitengruppe als Ursache dafür gleichermaßen ausgeschlossen werden konnte. Überdies konnten stimulussensitive Polymere mit Proteinliganden dargestellt werden.

## 5.5 Umsetzung der Maleimidbausteine zur Darstellung von Proteinkonjugaten

### 5.5.1 Anwendung der AMDs

In diesem Kapitel (5.5.1) werden die Ergebnisse der Anwendung der Azobenzenealkylmaleimidbausteine aus der Publikation „*Synthesis of azobenzenealkylmaleimide probes to photocontrol the enzyme activity of a bacterial histone deacetylase-like amidohydrolase*“ (115) zusammengefasst. Die einzelnen Aussagen zu den Ergebnissen werden nicht erneut zitiert.

Die dargestellten Derivate **6a – e** (Kap.: 5.1.2) sind lichtschtbare Moleküle, die spezifisch mit Thiolgruppen reagieren können. Mit dieser Molekülserie lassen sich Photochrome kovalent an Proteine binden, und somit lichtschtbare Proteinen darstellen. Durch die Verwendung der verschiedene Derivate mit unterschiedlichen Alkylspacernlängen kann der Abstand zwischen der Azobenzengruppe und der Proteinoberfläche, und somit der Einfluss dieser Gruppe auf das Protein, variiert werden. Hierfür wurden Mutanten von HDAH (Abbildung 5-49) verwendet bei denen ein Methionin im Loop nahe dem Aktivzentrum gegen ein Cystein mittels Mutagenese ausgetauscht wurde. Anschließend wurde eine Reihe Enzym-AMD-Konjugate hergestellt und diese hinsichtlich ihrer Aktivität in Abhängigkeit der Konfiguration untersucht. In Vorversuchen wurde die Aktivitätshemmung der Bausteine als freie Liganden bestimmt. Hierfür wurden  $IC_{50}$ -Werte der AMDs in der *cis*- und *trans*-Konfiguration gegen die HDAH Variante C51S bestimmt. Diese Mutante enthielt keine Cysteinseitengruppe, das natürliche Cystein C51 wurde gegen Serin ausgetauscht. Alle Derivate in der *cis*- wie auch in der *trans*-Konfiguration inhibierten nur sehr schwach. Der bestimmte  $IC_{50}$ -Wert lag über  $10\ \mu\text{M}$  und ließ sich auf die DMSO-Konzentration zurückführen, die während der Bestimmung mit der ansteigenden Ligandkonzentration eingetragen wurde.

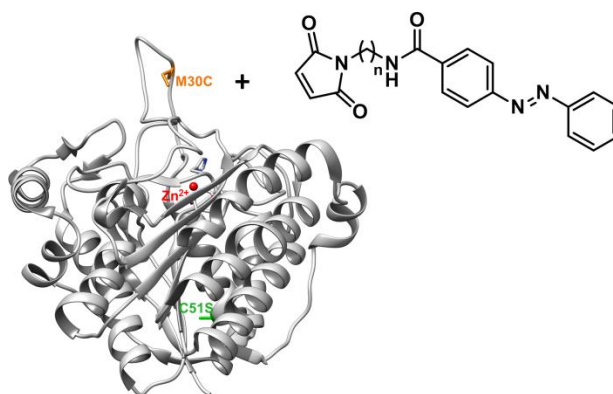


Abbildung 5-49: Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase mit dem Zinkion im Aktivzentrum. Die hervorgehobenen Aminosäuren C51S und M30C geben die Position zur Mutagenese, und somit zur Darstellung der Mutanten an. Die AMDs werden an die Thiolgruppe der Cysteinseitengruppe an Position 30 konjugiert.

Die AMDs **6a – e** konnte durch Michael-Addition an die HDAH Variante M30C in einem 1:1 Verhältnis (bis auf **6c**: 0.8:1) konjugiert werden. Dieses wurde durch Degree-of-Labeling-Bestimmung nach Gelpermeationschromatographie bestätigt. Anschließend wurde die Aktivität der Mutante, vor der Konjugation und nach der Konjugation, in Abhängigkeit der Konfiguration des Azobenzens bestimmt. Hierfür wurden die Michaelis-Menten-Parameter  $K_m$  (Michaelis-Konstante) und  $v_{max}$  (maximale Umsatzgeschwindigkeit) ermittelt und ins Verhältnis zur unmodifizierten Variante gesetzt (Abbildung 5-50).

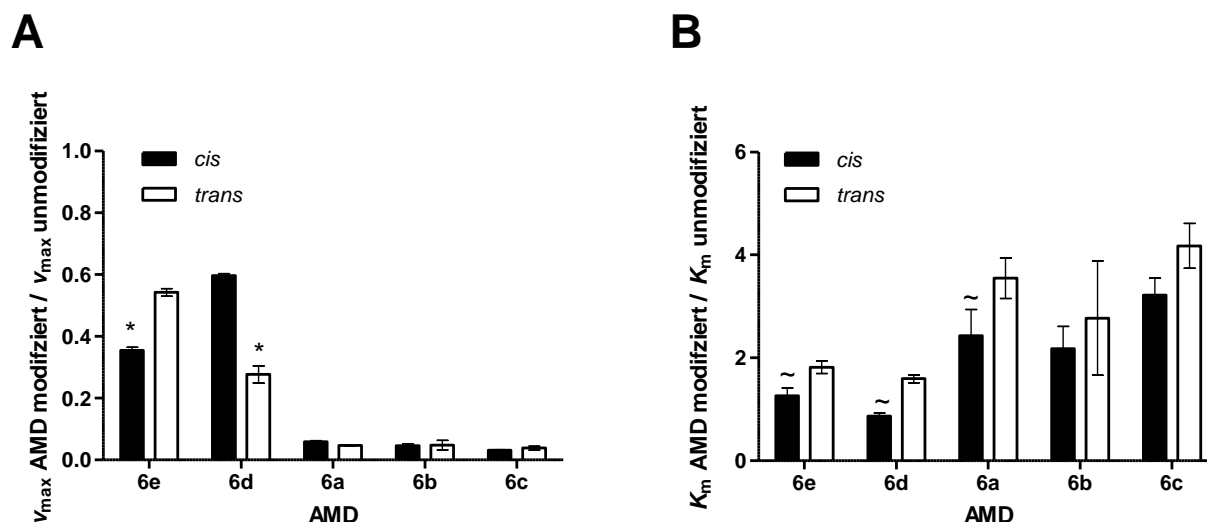


Abbildung 5-50: Relative  $v_{max}$ - und  $K_m$ -Werte der Biokonjugate von HDAH der Azobenzalkylmaleimiden **6a–e**. Die AMDs sind nach der Anzahl der Methylengruppen im Alkyllinker aufgetragen (**6e**: n=1; **6d**: n=2; **6a**: n=3; **6b**: n=4; **6c**: n=6).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität nach der Konjugation – bei allen AMDs – vermindert wurde. Bei den Biokonjugaten der AMDs **6a–c**, mit drei, vier und sechs Methyleneinheiten war nur noch eine geringe Aktivität von unter 6 % vorhanden. Bei den anderen Varianten war die Aktivität gegenüber der unmodifizierten Variante nur um 40 % – 72 % verringert. Außerdem konnte hier ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Konfigurationen des Azobenzens beobachtet werden, sodass die Parameter  $v_{max}$  und  $K_m$  der Konjugate durch die Konfigurationsänderung des Azobenzens geschaltet werden konnten. Durch Photoisomerisierung von *trans* zu *cis* konnte für das Konjugat **AMD6e/HDAH M30C** der  $v_{max}$ -Wert um 35 % erniedrigt und für **AMD6d/HDAH M30C** – von *cis* nach *trans* – um 54 % erniedrigt werden. Die  $K_m$ -Werte der Konjugate von AMD **6e** (44 %) und **6d** (84 %) konnte durch *cis-trans*-Isomerisierung ebenfalls erniedrigt werden. In einer vorherigen Publikation (114) führte die Isomerisierung zur *cis*-Konfiguration zu einem Aktivieren des Enzymkonjugats. Dieses stimmt mit den meisten Ergebnissen (vgl. Abbildung 5-50) überein, lediglich der relative  $v_{max}$  des **AMD6e/HDAH M30C** ist in der *trans*-Konfiguration höher als in der *cis*-Konfiguration. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die sterische Blockierung des Substratkanals durch das *cis*-Azobenzens, jedoch



ohne eine Konformationsänderung am Enzym zu initiieren. Diese Änderung nahe dem Aktivzentrum könnte allerdings durch das hydrophobere *trans*-Isomer erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass der Abstand zwischen der Proteinoberfläche und des Photochromes, somit die Linkerlänge des Bausteines, einen Einfluss auf die Aktivität der Biokonjugate ausübt. Ebenso, dass durch die Photoisomerisierung am Enzym ein Wechsel der Proteinaktivität induziert werden konnte. Möchte man die eigentliche Effizienz der Photoschaltung betrachten, so muss man den Isomerisierungsgrad der Azobenzengruppe im photostationären Zustand berücksichtigen. Die beiden Isomere, insbesondere das *cis*-Isomer, liegen immer als Isomerengemisch vor. Bei der Verwendung des *cis*-Isomers wurde lediglich der maximal mögliche Anteil durch Bestrahlung erreicht – der photostationäre Zustand. Der Isomerisierungsgrad wurde durch die Bestrahlung von (*E*)-1-(4-(phenyldiazenyl)phenyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (4-PAM) in DMSO-*d*<sub>6</sub> und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie dieses Moleküls bestimmt. Die Ergebnisse wurden anschließend auf die in Wasser verwendeten AMDs übertragen. Durch Bestrahlung mit Blaulicht konnten ein *cis/trans* Verhältnis von 24.7 % zu 75.3 % erzielt werden, bei der Isomerisierung mit UV-Licht ein *cis/trans* Verhältnis von 53.5 % zu 46.5 %. Mit diesen Verhältnis und den bereits bestimmten Werten ließen sich theoretische  $v_{\max}$ -Werte der Konjugate für eine vollständige Isomerisierung berechnen, Tabelle 5-19.

Tabelle 5-19: Relative  $v_{\max}$ -Werte für die Konjugate bei einer theoretischen vollständigen Isomerisierung.

AMD	rel. $v_{\max}$ in $\text{nM} \times \text{s}^{-1}$	
	<i>cis</i>	<i>trans</i>
<b>6e</b>	0.35	4.59
<b>6d</b>	6.47	0.02

Durch die Berücksichtigung des photostationären Zustandes bei der Berechnung der relativen maximalen Umsatzgeschwindigkeit werden die Tendenzen der beiden Konjugate hinsichtlich des aktiveren Isomerkonjugates verstärkt. Daraus folgt, dass die Enzymkonjugate bei vollständiger Isomerisierung nahezu vollständig photoschaltbar wären. Für **6e** kann eine theoretische Photoschaltungseffizienz von 92 % und für **6d** von 99 % angenommen werden.

Mit dieser Serie an biokonjugierbaren, photoschaltbaren Molekülen konnte der Einfluss der Linkerlänge und der Konfiguration auf die Aktivität einer HDAH Variante gezeigt werden. Diese waren – abhängig vom verwendeten Baustein – inaktiv oder ließen sich durch Photoschaltung aktivieren bzw. deaktivieren. Bei einer theoretischen, vollständigen Isomerisierung des Photochromen konnte für zwei Konjugate außerdem eine nahezu totale Photoschaltung berechnet werden. Die Ergebnisse verdeutlichten die Bedeutung der Einflüsse von den Konstitutionsfaktoren, Linkerlänge und Konfiguration der

---

verwendeten Lichtschalter, auf die Photoschaltbarkeit. Zur Darstellung eines photoschaltbaren Enzyms müssen, neben den biotechnologischen Fragestellungen, wie Position der reaktiven Aminosäure, evtl. Mutagenese, Aktivität der Mutante, auch die chemischen Fragestellungen betrachtet werden. Die dargestellte Serie, die thiolreaktiven Azobenzalkylmaleimide, ermöglicht eine sukzessive Betrachtung eines Biomoleküls hinsichtlich der intramolekularen Wechselwirkungen zwischen Lichtschalter und Protein in der Nähe des Aktivzentrums. Diese Strategie stellt eine Möglichkeit zur Optimierung von lichtschaltbaren biologischen Systemen, wie anderen Enzymen oder Ionenkanälen, dar.

## 5.5.2 Umsetzung der Maleimidpolymeren

Die dargestellten Maleimidpolymere besitzen verschiedene Seitengruppen, die verschiedene Aufgaben erfüllen. PDMAA und der eingebaute Azobenzenbaustein AZEA bilden die *Lichtschaltbare Einheit*, der Maleimidbaustein ist die *Proteinreaktive Gruppe* (Abbildung 5-51). Die eingeführte thiolreaktive Maleimidgruppe dient zur kovalenten Biokonjugation des Polymers an Proteine durch die Ausbildung einer Thioetherbindung mit Cysteinseitengruppen. Alternativ zu Proteinen lassen sich auch andere Moleküle mit Sulfhydrylgruppen an die Polymere binden. Diese könnten als Testsysteme dienen, oder es ließe sich der Einfluss anderer Gruppen auf das Polymer charakterisieren.

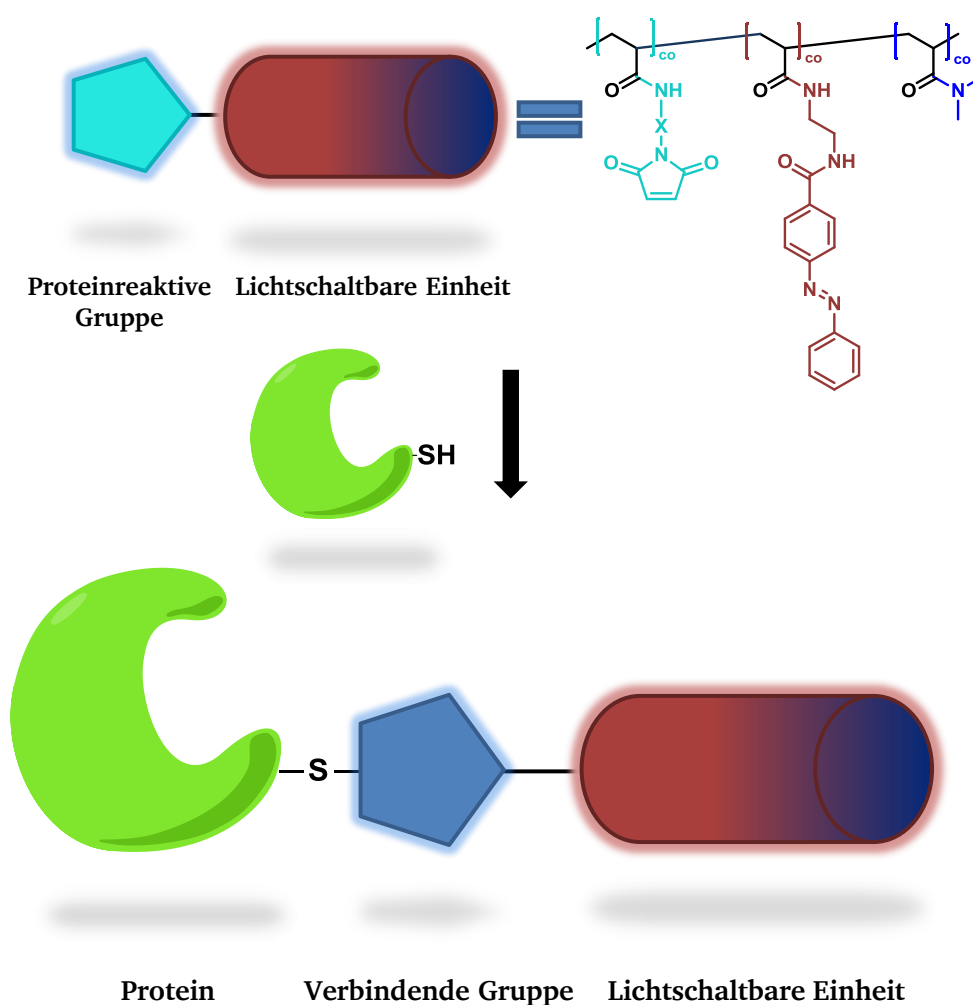
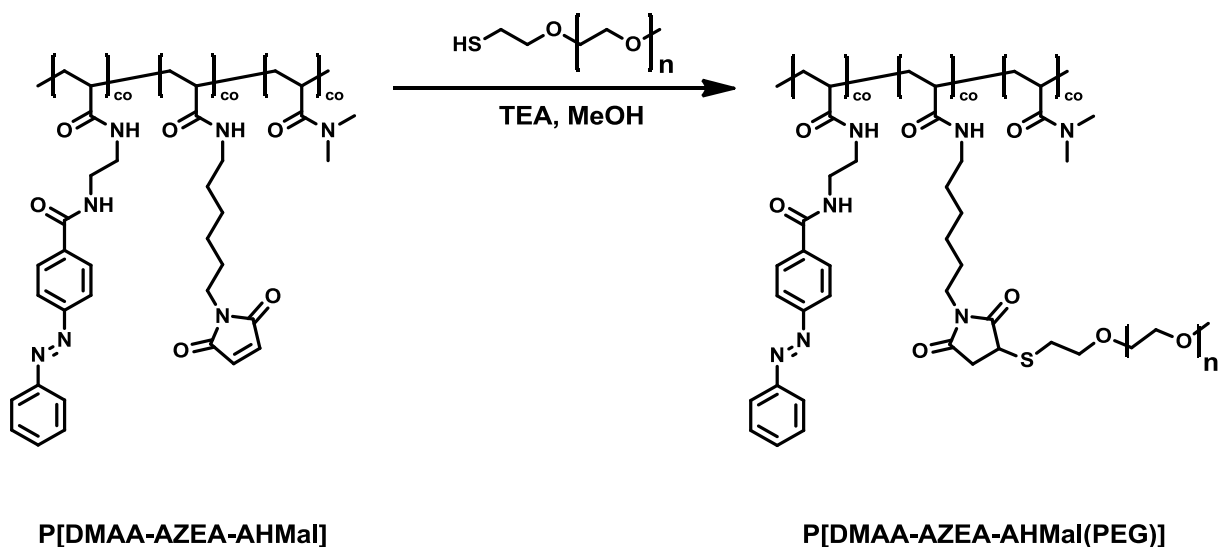


Abbildung 5-51: Schematische Darstellung der Konjugation eines Maleimidpolymers an eine exponierte Cysteinseitengruppe eines Proteins.

### 5.5.2.1 Konjugation an PEG-Thiol

Um den Einbau der Maleimidgruppe indirekt zu bestätigen, wurden die Polymere mit einem PEG-Thiol umgesetzt. Dafür wurden die Polymere in MeOH gelöst und 400 eq. Poly(ethyleneglycol)-methyletherthiol ( $M_n$ : 800 g/mol) pro Maleimidegruppe und 5 eq. TEA wurden hinzugeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und anschließend gegen Wasser dialysiert.



Schema 5-20: Konjugation eines PEG-Thiol an die Maleimidgruppe des Eduktes **P[DMAA-AZEA-AHMal]** zur Darstellung des pegylierten Polymers **P[DMAA-AZEA-AHMal(PEG)]**.

Tabelle 5-20: Polymerzusammensetzungen der pegylierten Polymere **P[DMAA-AZEA-AHMal(PEG)]** 1 – 5. Anteile der Bausteine berechnet vor der Umsetzung mit DMA, AZEA und eingebaut nach der Umsetzung mit dem PEG-Thiol.

Nr.	Edukt Nr.:	AZEA			AHMal			DMAA			AHMal(PEG)	Ausbeute
		ber.: <sup>a</sup>	gef.: <sup>b</sup>	gef.: <sup>c</sup>	ber.: <sup>a</sup>	gef.: <sup>b</sup>	gef.: <sup>c</sup>	ber.: <sup>a</sup>	gef.: <sup>b</sup>	gef.: <sup>c</sup>	gef.:	
in %												
1	1	19.0	19.1	18.9	10.0	4.5	3.4	71.0	76.4	76.4	1.3	quant
2	2	7.0	18.3	18.5	10.0	4.3	-	83.0	77.4	78.7	2.8	quant
3	3	10.0	19.6	15.3	5.0	2.6	-	85.0	76.5	78.8	5.9	quant
4	4	15.0	25.0	24.5	10.0	6.4	-	75.0	68.6	58.3	17.2	quant
5	5	10.0	17.9	20.7	15.0	9.0	-	75.0	73.1	57.0	22.1	quant

a und b: berechnet und gefunden vor und nach der Umsetzung mit DMA, AZEA, AHMal; c: gefunden nach der Umsetzung mit PEG-Thiol.

Die Charakterisierung erfolgte über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, siehe Abbildung 5-52. Das Integral der Azobenzengruppe (e – i) wurde dem der AHMal-Gruppe – falls noch vorhanden – gegenüber ge-

stellt und die Differenz zum Ausgangspolymer berechnet. Die Differenz wurde als umgesetztes Produkt interpretiert, mit deren Anteil ließ sich das Integral für die AHMal(PEG)-Gruppe (j – p) berechnen (89.4 Protonen). Das Integral von 4.0 bis 1.0 ppm, abzüglich der Protonen für die Gruppen AZEA, und AHMal(PEG) entspricht dem Integral für DMAA. Die berechnete Polymerzusammensetzung entspricht der Zusammensetzung des Ausgangspolymer. Bei den letzten drei Variationen ist der Anteil an AHMal(PEG) höher als erwartet, dadurch verändert sich die rechnerische Zusammensetzung des Polymers. Dies deutet auf eine nicht vollständig abgeschlossene Dialyse hin.

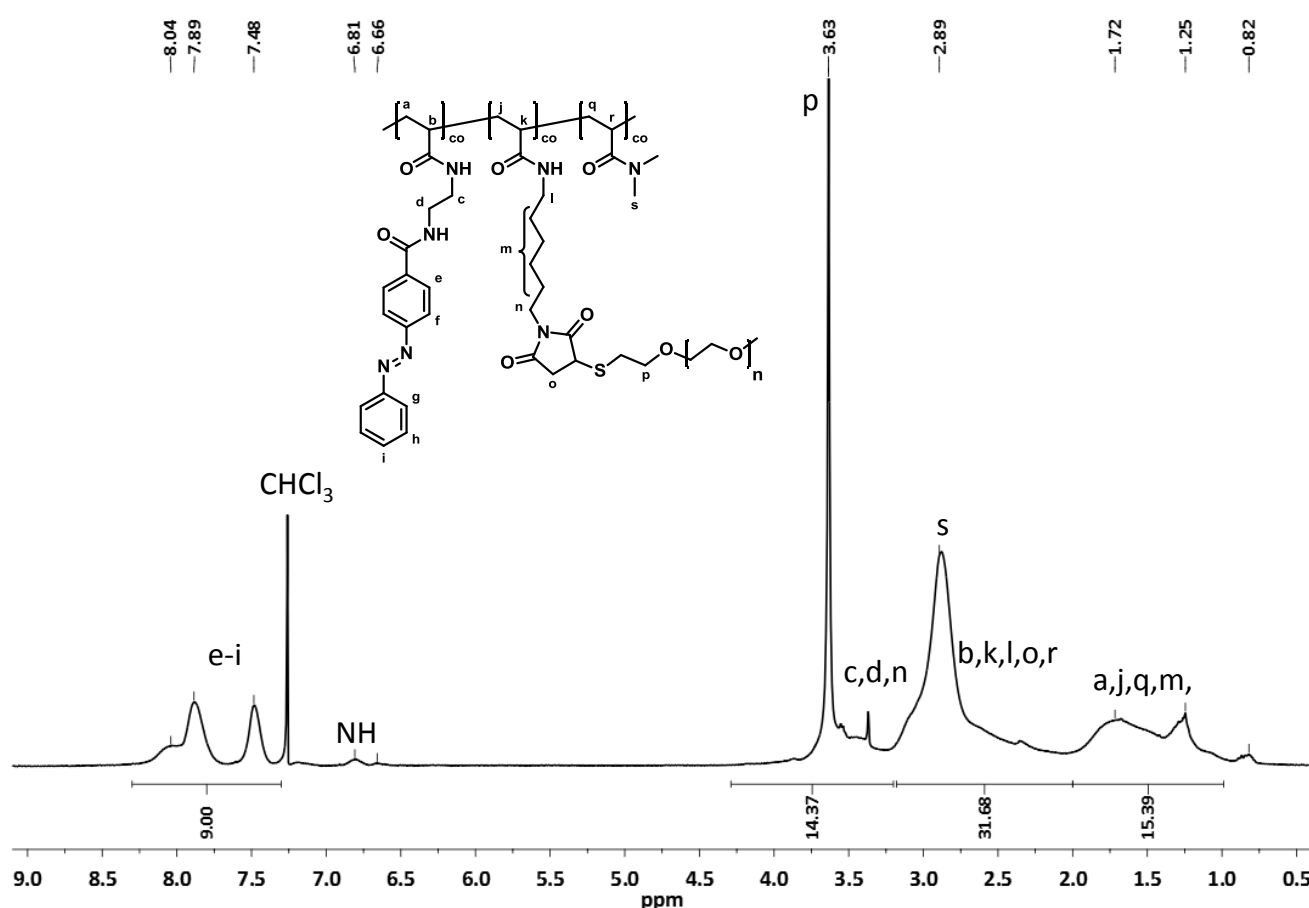


Abbildung 5-52:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des mit PEG-Thiol umgesetzten Maleimidpolymers **P[DMAA-AZEA-AHMal(PEG)] 2**. Das Signal der Maleimidgruppe ist nicht mehr vorhanden, ein Signal für die PEG-Gruppe (p) bei 3.63 ppm bestätigt die Reaktion des Thiols mit dem Maleimid.

Die Ergebnisse zeigten, dass Umsetzungen mit den Maleimidpolymeren möglich sind. Die Maleimidgruppe war exponiert und konnte mit der Thiolgruppe reagieren, außerdem war ein vollständiger Umsatz der Seitengruppe möglich.

### 5.5.2.2 Konjugation von Maleimidpolymeren an HDAH

Die dargestellten Maleimidpolymere können zur Biokonjugation verwendet werden. Die Konjugationen wurden wie in dem Kapitel Methoden und Geräte beschrieben durchgeführt. Hierfür stehen diverse Polymere und HDAH-Varianten zur Verfügung. Neben dem Wildtyp (HDAH-wt) wurden die Konjugationen auch an den Mutanten S26C und M36C durchgeführt. Die Visualisierung der Konjugate erfolgte durch Auftrennen der Konjugatlösung mittels eines 10%igen Acrylamidgels und anschließender Anfärbung.

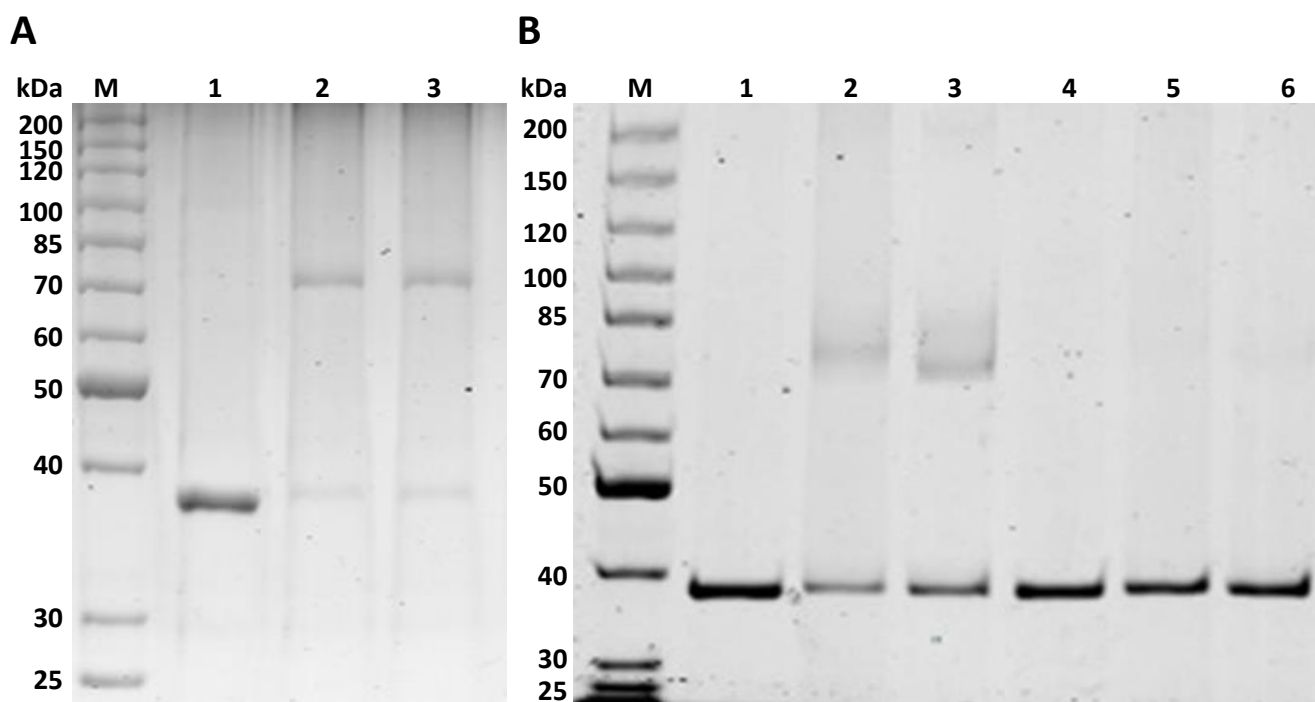


Abbildung 5-53: SDS-Gele von HDAH nach der Umsetzung mit Maleimidpolymeren. A: HDAH-wt wurde mit **P[DMAA-AZAA-Mal] 1** umgesetzt. Spur M zeigt den Marker, Spur 1 die Negativkontrolle (HDAH-wt), auf Spur 2 und 3 sind die Konjugatlösungen aufgetragen. Bei Spur 2 wurde das Protein mit einem 40-fachen Überschuss an Maleimid umgesetzt, in Spur 3 mit einem 20-fachen Überschuss. B: SDS-Gel verschiedener HDAH-Varianten nach Konjugation mit **P[DMAA-AZAA-Mal] 1** und **2**. Spur M zeigt den Marker, Spur 1 die Negativkontrolle von S26C, Spur 2 und 3 nach Umsetzung mit **P[DMAA-AZAA-Mal] 1** und **2**. Spur 4 Negativkontrolle von M36C, Spur 5 und 6 nach Umsetzung mit **P[DMAA-AZAA-Mal] 1** und **2**.

Das Gel (Abbildung 5-53 A) zeigt in den Spuren 2 und 3 neue Banden bei ca. 70 kDa für die Konjugate und schwächere Banden bei ca. 37 kDa für das unmodifizierte Enzym. Dieses deutet auf eine erfolgreiche, wenn auch nicht vollständige, Konjugation hin. Zur Optimierung der Konjugation wurden die Polymere **P[DMAA-AZAA-Mal] 1 – 4**, die sich anhand ihres Maleimidlinkers und des Anteils des Maleimidbausteines unterscheiden, für die nachfolgenden Konjugationen verwendet. Die Polymere konnten an das Protein gebunden werden, jedoch wieder nicht vollständig. Ein Unterschied zwischen dem 20- und dem 40-fachen Überschuss der Maleimidgruppe war nicht erkennbar, ebenso war kein Unterschied zwischen den verwendeten Maleimidbausteinen mit den verschiedenen Linkern erkennbar. Es konnte allerdings ein Unterscheid zwischen den verwendeten Ausgangspolymeren, und

---

somit bei der Konzentration der Maleimidbausteine, beobachtet werden. Polymere mit einer Maleimidkonzentration von 13 % bzw. 7 % (**P[DMAA-AZAA-Mal] 1 – 2**) modifizierten das Enzym in einem höheren Maße als die Polymere mit einer Maleimidanteil von 3.3 % bzw. 2.5 % (**P[DMAA-AZAA-Mal] 3 – 4**). Des Weiteren wurde untersucht, ob die Position des Cysteins im Protein einen Einfluss auf den Konjugationsgrad ausübt. Dafür wurden die Mutanten S26C und M36C von HDAH verwendet und mit den Polymeren **P[DMAA-AZAA-Mal] 1** und **2** modifiziert. Während sich die Mutante S26 in ähnlichem Maße modifizieren ließ wie der Wildtyp, konnte bei der Mutante M36C keine Modifikation im Gel nachgewiesen werden, siehe Abbildung 5-53 B. Zur Erhöhung des Konjugationsgrades wurden die nachfolgenden Konjugationen von HDAH-wt und **P[DMAA-AZAA-Mal] 1** mit verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde die Reaktionszeit von 16 h auf 40 h, die Reaktionstemperatur von 4 °C auf 23 °C und die Konzentration des Proteins im Kupplungsansatz von 20 µM auf 40 µM erhöht bzw. variiert. Diese Bedingungen wurden untereinander kombiniert, um Kreuzeffekte ausschließen zu können. Die Auswertung der Ansätze in einem SDS-Gel zeigte keine Veränderung des Konjugationsgrads in Abhängigkeit der variierten Parameter.

Um dennoch ein Polymer-Protein-Konjugat ohne unkonjugiertes Protein zu bekommen, wurden verschiedene Proteinaufreinigungsmethoden angewendet. Da eine Trennung im SDS-Gel zuerkennen war, wurde geprüft, ob sich das Konjugatgemisch über eine Gel-Permeations-Chromatographie aufreinen lässt. Dazu wurden die Konjugatansätze vereinigt, filtriert (0.25 µm) und durch einen Konzentrator (MWCO 20 kDa) bis zu einem Volumen von 500 µL aufkonzentriert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine GPC-Säule (16/60; Volumen: 120 mL) aufgetragen und mit einem Natrium-Phosphat-Puffer (pH 8) eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch einen UV-Detektor (280 nm) analysiert, dabei ergaben sich zwei Signale. Diese wurde vereinigt, aufkonzentriert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen des ersten Peaks enthielten weiterhin das Produktgemisch in einer ähnlichen Zusammensetzung, hier ist keine Trennung erfolgt. In den Fraktionen des zweiten Peaks ließ sich kein Protein nachweisen. Dieses korrelierte auch mit dem anschließenden BCA-Test (Bicinchoninsäure, Testsystem zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen). Eine Aufreinigung durch Gel-Permeations-Chromatographie war somit nicht möglich.

In weiteren Versuchen konnte die unvollständige Konjugation reproduziert werden. Eine Trennung des Gemisches durch andere chromatographische Verfahren wie Anionenaustauschchromatographie oder Hydrophobe-Interaktionschromatographie führte ebenfalls nicht zum gewünschten reinem Konjugat. Eine Trennung durch Kationenaustauschchromatographie war aufgrund des berechneten pI von 5.83 und des Aktivitätsverlust bei niedrigen pH-Werten nicht möglich. Die Maleimidpolymere **P[DMAA-AZEA-AHMal] 1** und **3**, die durch die polymeranaloge Umsetzung an **PPFPA** dargestellt wurde, konnten ebenfalls mit dem HDAH-wt umgesetzt werden. Allerdings erfolgte auch hier die Umsetzung nur partiell und unkonjugiertes Enzym verblieb im Reaktionsansatz.

Ziel dieser Arbeit war es, biokonjugierbare und stimulussensitive Systeme darzustellen, zu charakterisieren und sie hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit zur Generierung von schaltbaren Protein-Konjugaten zu untersuchen. Als Systeme wurden kleine organische Moleküle und Makromoleküle verwendet, die lichtschtbare Gruppen und eine oder mehrere proteinreaktive Maleimidgruppen aufwiesen.

In Kapitel 5.1 und Kapitel 5.5.1 ist die Synthese und die Anwendung der kleinen organischen Moleküle beschrieben. Diese bestehen aus der lichtschtbaren Gruppe, einem Alkyl linker und der Maleimidgruppe. Aus diesen drei Gruppen generiert sich der Name: *Azobenzalkylmaleimid* (AMD). Für die Synthese einer Serie mit unterschiedlich langen Alkyl linkern wurden diverse Aminoalkylmaleimide dargestellt und mit einem Azobenzbaustein umgesetzt. Da das benötigte Aminomethylmaleimid aus den Ausgangsverbindungen nicht zugänglich war, wurde der Aminomethylamidbaustein **8** durch Hoffmann-Eliminierung dargestellt; diese Decarbonylierung wird meist an polaren und wasserlöslichen Bausteinen durchgeführt. Die Umsetzung des unpolaren Azobenzderivats **7** mit der hypervalenten Iodbenzol-Verbindung [Bis(trifluoracetoxylod]benzol (PIFA) in einem DMSO/Wasser Gemisch führte dennoch zu der gewünschten Zwischenstufe **8**. Die Azobenzalkylmaleimide wurden anschließend an Mutanten von HDAH konjugiert. In Abhängigkeit der Konfiguration des Photochromes wurde die Aktivität des Enzyms betrachtet und in Relation zu der unmodifizierten Variante gesetzt. Hierbei zeigte sich, dass längere Alkyl linker – bei diesen Enzym-Photoschalter-Konjugaten – zu einer Desaktivierung des Proteins führten. Die beiden kürzesten Bausteine waren am effektivsten, mit ihnen ließ sich die Proteinaktivität (bestimmt durch  $v_{\max}$  und  $K_M$ ) signifikant schalten.

In Kapitel 5.2 wird die Synthese der Polymere beschrieben. Die Idee eines stimulussensitiven, nahe dem Aktivzentrum konjugierten Liganden, sollte durch die Verwendung von Makromolekülen erweitert und optimiert werden. Eine induzierte Konformationsänderung des Polymers könnte sich viel stärker auf die Proteinaktivität auswirken, und somit die Proteinschaltung maximieren. Die hierfür verwendeten Polymere mussten mehrere Bedingungen erfüllen. Sie mussten:

- wasserlöslich,
- proteinreaktiv und
- lichtschtbar bei ca. 20 bis 40 °C sein.

Lichtschtbar und wasserlöslich sind zusammengehörige Eigenschaften, da die meisten bekannten lichtschtbaren Polymersysteme auf einer isothermen Verschiebung der Phasenübergangstemperatur von temperatursensitiven Polymeren beruhen. Als licht- und temperatursensitive Systeme



---

wurden Polydimethylacrylamidpolymere mit Azobenzengruppen verwendet. Als weitere Analogie zum ersten System wurde Maleimid, als proteinreaktive Gruppe, ebenfalls beibehalten. Die Einführung der Gruppe erfolgte durch polymeranaloge Umsetzung an Aktivesterpolymeren. Für die Darstellung der Polymere wurden verschiedene Acrylatbausteine synthetisiert. Mit diesen Monomeren wurden **P[DMAA-AZAA-NAS]** Aktivesterpolymere synthetisiert. Die Charakterisierung über  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie lieferte nur begrenzte Aussagen, da die charakteristischen Signale des NAS-Bausteines von den Signalen der Methylgruppen des PDMAA überlagert wurden. Die Aktivestergruppen konnten jedoch über  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie detektiert werden. Außerdem konnten sie, mit einer indirekten Methode, quantitativ durch UV/Vis-Spektroskopie nach Umsetzung mit Fmoc-Lysin bestimmt werden. Die **P[DMAA-AZAA-NAS]** Polymere zeigten ein temperatursensitives Verhalten. Da die Aktivestergruppe hydrolysiert wurden, war dieses jedoch nicht reproduzierbar. Diese Hydrolyse wurde durch die Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda=460\text{ nm}$ ) verstärkt, sodass die LCST-Bestimmung in der *cis*-Konfiguration der Azobenzengruppen nicht möglich war. Für die Umsetzung an den Polymeren wurden Aminoalkylmaleimidbausteine verwendet, die entweder kommerziell erhältlich waren, wie Aminoethylmaleimid, oder selbst dargestellt wurden, wie **4c** (**AHMal**) und **13** (**APEGMal**). Hierbei wurde die strategische Verwandtschaft zum ersten System – der Azobenzalkylmaleimide – ausgenutzt, da die Bausteine **AEMal** und **AHMal** dort ebenfalls verwendet wurden.

Die beiden Maleimidbausteine **4c** und **13** mit den längeren Linkern konnten eingebaut werden. Die Umsetzung von Aminoethylmaleimid mit **P[DMAA-AZAA-NAS]** war nicht erfolgreich. Die Polymere **P[DMAA-AZAA-APEGMal]** und **P[DMAA-AZAA-AHMal]** zeigten keine temperatursensitiven Eigenschaften, konnten aber an HDAH konjugiert werden – wenn auch nie vollständig. Durch Variation verschiedener Parameter konnte der Umsatz nicht erhöht werden. Eine Aufreinigung des Protein/Protein-Konjugat Gemisches war ebenfalls nicht erfolgreich. Diese Schwierigkeiten bezüglich des Maleimideinbaus, der Generierung eines temperatursensitiven Polymers und der vollständigen Konjugation wurden durch die folgende Synthesestrategie gelöst.

Aktivesterpolymere aus Polypentafluorphenylacrylat wurden synthetisiert, um das Polymersystem – durch den Einbau verschiedener Seitengruppen zu unterschiedlichen Anteilen – besser kontrollieren zu können. An den Aktivestergruppen lassen sich diverse Aminbausteine binden. Somit lassen sich verschiedene Polymere, die alle von dem gleichen Ausgangspolymer abstammen, darstellen. Die durch Polymerisationsreaktionen entstehenden Variationen im Polymerisationsgrad und der Polydispersität lassen sich dadurch weitestgehend minimieren. Diverse Alkylamine konnten an die Polymere gebunden und so eine Vielzahl an Copolymere generiert werden. Hierfür wurden, neben den käuflichen Aminen Dimethylamin und Isopropylamin, auch selbst dargestellte Bausteine, wie **15** (**AZEA**) und **17** (**AHSAHA**), verwendet. Als Maleimidbaustein wurde das bereits vorhandene Aminohexylmaleimid **4c** (**AHMal**) verwendet. Bei den meisten Polymeren, die ausgehend von **PPFPA** hergestellt wurden,

---

entsprach die Einbaurate in etwa dem berechneten Anteil des Bausteines. Die Umsetzung mit Amino-hexylmaleimid **4c** lief allerdings nicht analog zu den übrigen Umsetzungen ab. Hier konnte der Einbau der Maleimidgruppe zuerst nie bestätigt werden. Spektroskopische Untersuchungen des Reaktionsverlaufes zeigten, dass die Reaktion zwischen der Aminogruppe und dem Polymer im Bereich von Minuten vollständig abläuft. Da die Polymere dennoch keine Maleimidgruppe aufwiesen, wurde die letzte Synthesestufe, die Zugabe des Dimethylamins zu dem Maleimidpolymer, genauer untersucht. Dafür wurde der Maleimidbaustein unter Reaktionsbedingung mit Dimethylamin umgesetzt. Die Charakterisierung der Reaktionslösung zeigte den Angriff des Dimethylamins an die Maleimidgruppe und dessen Zerstörung an. Nachfolgend wurde der Syntheseweg der **P[DMAA-AZEA-AHMal]** Polymere umgestellt. Erste Versuche mit einer veränderten Reihenfolge in einer „Ein-Topf-Reaktion“ lieferten nicht die gewünschten Polymere. Daraufhin wurden die ternären Polymere über drei Synthesestufen aufgebaut, inklusive Aufreinigung und Analytik. Der Anteil der jeweiligen Seitengruppe und die Größenverteilungen der Polymere konnten über diesen Weg, durch die Verwendung der Aktivesterpolymervorstufen, kontrolliert werden. Die Trübungstemperaturen der Polymere ließen sich allerdings weiterhin kaum prognostizieren, da die LCST nicht nur von der aromatischen Azobenzengruppe, sondern auch unerwartet stark von dem Maleimidbaustein beeinflusst wurde. Die Polymere waren nur innerhalb eines kleinen Konzentrationsbereiches (0.1 % – 1.0 % (m/V)) schaltbar. Oberhalb bzw. unterhalb dieses Bereiches waren sie schlecht löslich oder der Phasenübergang war schwach ausgeprägt. Des Weiteren kam es zu einer Erhöhung der LCST beim wiederholenden Bestimmen. Dieses abweichende Verhalten wurde bisher nicht beschrieben und wurde versucht aufzuklären. Das hierfür dargestellte **P[DMAA-AHMal]** Polymer – ohne eine Azobenzengruppe – zeigte eine LCST, aber keine Verschiebung der Trübungstemperatur. **P[DMAA-AZEA]** Polymere, ohne die AHMal-Seitengruppe, zeigten allerdings dieses Verhalten.

Die Schaltungseffizienz der Azobenzengruppe – im Polymer und als ungebundener Aminbaustein – wurde ebenfalls untersucht. Dafür wurden Lösungen (DMSO und Wasser) eines azobenzehaltigen Polymers und des Azobenzenbausteines **15** hergestellt und mit UV/Vis-Spektroskopie und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie, vor und nach der UV-Lichtbestrahlung, charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Isomerisierungen nicht vollständig verlaufen. Außerdem wurde festgestellt, dass die Isomerisierung der Azobenzengruppen im Polymer abhängig ist vom Lösemittel und von der Polymerkonzentration.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Wege zur Darstellung von biokonjugierbaren lichtschaltbaren Systemen beschrieben. Die neue Serie von kleinen organischen Molekülen stellt eine vielversprechende Variante dar, um Proteine durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge schalten zu können. Dieses wurde auch bereits bei einigen Konjugaten erfolgreich umgesetzt.

---

Die Darstellung dieser Systeme durch die Verwendung von Polymeren ist besonders reizvoll – allerdings auch anspruchsvoller. Polymeranaloge Umsetzungen an dem P[DMAA-AZAA-NAS]-System führten zu den gewünschten Maleimidpolymeren, Konjugationen dieser Polymere am Protein (HDAH) konnten damit durchgeführt werden. Allerdings war bei diesem Polymersystem die Reproduzierbarkeit nicht immer gegeben.

Mit dem PPFPA-Polymersystem wurde dieses Problem beseitigt, ebenso ließen sich andere faszinierende Bausteine, wie ein Hydroxamsäure-Derivat, einbauen. Hydroxamsäuren stellen eine bedeutende Inhibitor-Klasse für HDACs dar und können spezifisch diese Proteine reversibel binden. Dieses konnte auch für das Hydroxamsäurepolymer **P[NIPAAm-AHSAHA]** gezeigt werden. Die, durch Umsetzung an **PPFPA** hergestellten, Maleimidpolymere konnten ebenfalls an das Zielprotein gebunden werden. Lediglich die Aufarbeitung des Polymer/Protein-Gemisches verhinderte die Darstellung von reinen Polymer-Protein-Konjugaten.

Anschließende Arbeiten können in zwei verschiedene Themenbereiche eingeteilt werden: die Weiterentwicklung von kleinen schaltbaren Bausteinen und die Weiterentwicklung der Polymere.

Um die räumliche Ausrichtung der Azobenzengruppe zu fixieren, könnte der flexible Alkyllinker der AMDs gegen steifere Peptidketten ausgetauscht werden. Dadurch ließen sich auch Stereozentren oder polare bzw. unpolare Gruppen einfügen. Eine weitere interessante Modifikation der AMDs ist die Verwendung von funktionellen Gruppen. Hydroxamsäuren oder Trifluormethylketone können an den aktiven Zentren mancher Proteinen/Enzymen mit katalytischen Metallkationen binden und die Enzyme inhibieren. Die Lichtschaltung wäre dann – bei den korrekten geometrischen Verhältnissen – mit der Präsenz eines Inhibitors kombiniert. Dadurch könnte sich die Schaltungseffektivität stark erhöhen lassen.

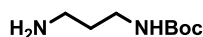
Die Ergänzungsmöglichkeiten bei den konjugierbaren Polymeren sind umfangreicher bzw. es bedarf einer neuen strategischen Ausrichtung zur Darstellung dieser Systeme. Da die Synthese der Systeme erfolgreich war, jedoch deren Schaltfunktionalität nicht immer wie gewünscht generiert werden konnte, ist dieses der erste verbesserungswürdige Punkt. Nachfolgend gilt es, die Anbindung an das Protein bzw. die Abtrennung von unkonjugiertem Protein und Polymer zu optimieren, um reines Polymer-Protein-Konjugat zu erhalten. Ferner ist die Darstellung von telechelen Polymeren und deren Endgruppenmodifizierung denkbar oder die Immobilisierung der Polymere – und somit später der Proteine – auf einer Oberfläche. Schließlich sind auch Systeme zur Proteinaufreinigung oder zur Proteomanalyse – neben den immobilisierten schaltbaren Biokatalysatoren – hochinteressante Zielanwendungen.

---

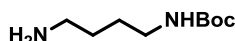
## 7 Experimenteller Teil

---

### 7.1 Vorstufen



*tert-butyl (3-aminopropyl)carbamate (1a)*: Di-*tert*-butyldicarbonat: (3.0 g, 14 mmol) wurde in DCM (20 mL) gelöst und zu Diaminopropan (5.7 g, 69 mmol) in DCM (100 mL) unter Argon zuge-  
tropft. Die Mischung wurde über Nacht bei rt gerührt, der Feststoff abfiltriert und das Filtrat eingengt. Danach wurde die wässrige Phase mehrmals mit EtOAc extrahiert und die organische Phase mit gesät-  
tigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel abgezogen. Das Produkt lag  
als farbloses Öl vor. Ausbeute: 1.7 g, 88 %. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; ausgewählte Daten): δ 4.96 (s,  
2H; H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-), 3.24 – 3.11 (m, 2H; -CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 2.73 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H; H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-), 1.66 – 1.50  
(m, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 9H; -Boc).

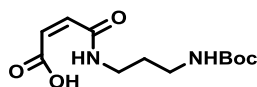


*tert-butyl (4-aminobutyl)carbamate (1b)*: Di-*tert*-butyldicarbonat (2.0 g, 9.16 mmol) wurde in  
DCM (20 mL) gelöst und zu 1,4-Diaminobutan (4 g, 45.8 mmol) in DCM (100 mL) zugetropft. Die  
Mischung wurde über Nacht bei rt gerührt, der Feststoff über Vakuum abfiltriert und das Filtrat einge-  
engt. Danach wurde EtOAc (100 mL) hinzugefügt und die organische Phase mehrmals mit gesättigter  
NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und  
Entfernen des Lösemittels blieb ein farbloses Öl zurück, das unbehandelt weiter verwendet wurde.  
Ausbeute: 950 mg; 55 %. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ausgewählte Daten): δ 4.71 (s, 1H, -NH-), 3.13  
(d, *J* = 5.8 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 2.74 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1.66 – 1.48 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-  
CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.49 – 1.35 (m, 9H, -Boc).

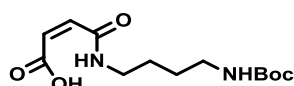


*tert-butyl (6-aminohexyl)carbamate (1c)*: Zu einer gekühlten Suspension (0 °C) von Diaminohe-  
xan (5.90 g, 50.77 mmol) in 60 mL DCM wurde Boc<sub>2</sub>O (2.22 g, 10.15 mmol) in 60 mL DCM hinzuge-  
tropft. Nach der Zugabe wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion für 18 h bei rt gerührt. Anschlie-  
ßend wurde das Lösemittel entfernt und 30 mL Wasser wurden hinzugegeben. Die trübe Mischung  
wurde für 1 h gerührt, dann filtriert und mit DCM extrahiert (2 x 50 mL). Die vereinigten organischen  
Phasen wurden mit H<sub>2</sub>O (2 × 20 mL) und gesättigter NaCl-Lsg. (20 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ge-  
trocknet, filtriert und eingengt. Es konnten 1.97 g (90 %) eines farblosen Öles erhalten werden.

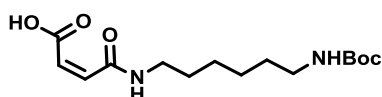
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.56 (s, 1H, -NH-), 3.09 (dd,  $J$  = 12.6, 6.3 Hz, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 2.83 – 2.58 (t, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 1.66 – 1.17 (m, 17H,  $4 \times \text{CH}_2$ ,  $\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).



*tert*-butyl (3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propyl)carbamate (**2a**): *tert*-butyl (3-aminopropyl)carbamate (**1a**) (1.7 g, 9.08 mmol) in DCM (15 mL) wurde zu eisgekühltem Maleinsäureanhydrid (960 mg, 9.08 mmol) in DCM (22 mL) zugetropft. Die Mischung wurde 3 h bei rt gerührt, danach mit gesättigter NaCl-Lösung und zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und das Lösemittel wurde entfernt. Das Zwischenprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel EtOAc / MeOH: 9:1,  $R_f$ : 0.24). Es wurden 2.26 g (85 %) eines farblosen Feststoff erhalten.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.38 (s, 1H;  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ), 6.44 – 6.26 (m, 2H;  $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$ ), 3.21 (dd,  $J$  = 12.3, 6.5 Hz, 4H;  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1.77 – 1.63 (m, 2H;  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1.44 (s, 9H; -Boc).



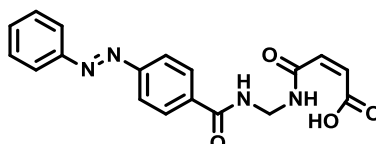
*tert*-butyl (4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl)carbamate (**2b**): *tert*-butyl (aminobutyl)carbamate (**1b**) (0.95 g, 5.06 mmol) in DCM (9 mL) wurde zu einer eisgekühlten Lösung aus Maleinsäureanhydrid (496 mg, 5.06 mmol) in DCM (13 mL) zugetropft. Die Mischung wurde 3 h bei rt gerührt, danach mit gesättigter NaCl-Lösung und zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösemittel entfernt. Das Zwischenprodukt wurde durch säulenchromatographisch aufgereinigt (Elutionsgradient Hexan / EtOAc: 85:15 – 20:80,  $R_f$ : 0.22) und lag als farbloser Feststoff vor. Ausbeute: 307 mg (19 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ausgewählte Daten):  $\delta$  8.55 (s, 1H,  $-\text{CH}-\text{COOH}$ ), 6.40 (dd,  $J$  = 40.1, 12.8 Hz, 2H,  $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$ ), 4.82 (s, 1H, -NH-), 3.42 (q,  $J$  = 5.8 Hz, 2H,  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ), 3.17 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, Boc-NH- $\text{CH}_2-$ ), 1.80 – 1.52 (m, 4H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ), 1.45 (s, 9H, -Boc).



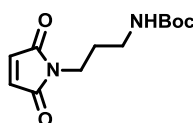
(*Z*)-4-((6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexyl)amino)-4-oxobut-2-enoic acid (**2c**):

2.45 g (11.3 mmol) *tert*-butyl (6-aminohexyl)carbamate (**1a**) wurden in DCM (24 mL) gelöst und zu einer eisgekühlten Lösung von Maleinsäureanhydrid (1.45 g, 11.3 mmol) in DCM (30 mL) getropft. Nach 3 h bei rt wurde die Reaktion mit gesättigter NaCl und zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösemittel entfernt. Durch säulenchromatographi-

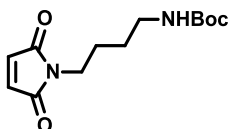
sche Aufreinigung (Elutionsgradient: Hexan / EtOAc: 85:15 → 20:80,  $R_f$ : 0.22) konnten 3.15 g (89 %) eines farblosen Feststoffes gewonnen werden.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.54 (s, 1H, -CH-COOH), 6.50 (d,  $J$  = 12.8 Hz, 1H, CO-CH), 6.31 (d,  $J$  = 12.8 Hz, 1H, CO-CH), 4.87 – 4.70 (m, 1H, NH), 3.37 – 3.24 (m, 2H, Boc-NH-CH<sub>2</sub>-), 3.08 (dd,  $J$  = 12.5, 6.1 Hz, 2H, CO-NH-CH<sub>2</sub>-), 1.63 – 1.28 (m, 17H, -Boc, 4×CH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.19, 166.28, 165.95, 156.46, 135.38, 132.22, 79.23, 60.41, 39.91, 29.94, 28.47, 28.35, 25.91, 25.68, 21.06, 14.21.



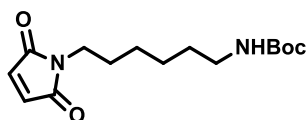
(*E*)-*N*-((2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)methyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide: Maleinsäureanhydrid (159 mg, 1.62 mmol) und DIPEA (660  $\mu\text{l}$ , 3.86 mmol) wurden zu 350 mg einer Mischung aus **7** und **8**, in DCM (16 mL) gelöst, gegeben und bei rt 4 h gerührt. Im Anschluss wurde 1 M HCl (15 mL) zugegeben, die wässrige Phase abgetrennt und die unvollständig gelöste organische Phase in Hexan präzipitiert, filtriert und der Filterkuchen getrocknet. Es konnten 319 mg eines orangefarbenen Feststoffs erhalten werden, dieser wurden nicht weiter aufgereinigt.



*tert*-butyl (3-((2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propyl)carbamate (**3a**): (*Z*)-4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)amino)-4-oxobut-2-enoic acid (**2a**) (2.12 g, 7.79 mmol) wurde mit wasserfreiem NaOAc (537 mg, 6.54 mmol) und Essigsäureanhydrid (9.6 mL, 101.3 mmol) für 3 h auf 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend abgekühlt und eisgekühlte gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung wurde zugegeben. Die wässrige Lösung wurde mit DCM extrahiert, die vereinigten organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt. Nach säulenchromatographisch Aufreinigung (Laufmittel Hexan / EtOAc: 1:1,  $R_f$ : 0.6) lag das Produkt als farbloser Feststoff vor. Ausbeute: 0.62 g (30%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.69 (s, 2H; -CO-CH=CH-CO-), 4.10 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H; Mal-CH<sub>2</sub>-), 3.07 (dd,  $J$  = 12.6, 6.3 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 1.83 – 1.66 (m, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.42 (s, 9H; -Boc).

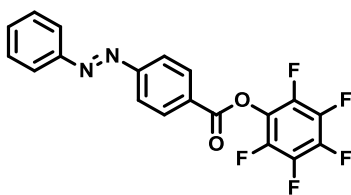


*tert*-butyl (4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl)carbamate (**3b**): (*Z*)-4-((4-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-oxobut-2-enoic acid (**2b**) (307 mg, 0.95 mmol) wurde mit wasserfreiem Natriumacetat (550 mg, 6.8 mmol) und Essigsäureanhydrid (9 mL, 12.6 mmol) für 3 h auf 110 °C unter Rühren erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde wieder auf Raumtemperatur abgekühlt, eisgekühlte gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben und mit DCM (40 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel entfernt und säulenchromatographisch aufgereinigt Eluent: Hexan / EtOAc: 4:1 → 3:2, R<sub>f</sub>: 0.5). Das Produkt lag als ein farbloser Feststoff vor. Ausbeute: 98 mg (38 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.69 (s, 2H, CO-CH=CH-CO), 4.54 (s, 1H, NH), 3.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, Mal-CH<sub>2</sub>), 3.13 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 1.68 – 1.53 (m, 4H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 1.44 (s, 9H, -Boc).

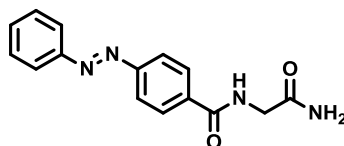


*tert*-butyl (6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl)carbamate (**3c**): (*Z*)-4-((6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexyl)amino)-4-oxobut-2-enoic acid (**2c**) (3.10 g, 9.86 mmol) wurde in Essigsäureanhydrid (12.3 mL) gelöst, mit wasserfreiem Natriumacetat versetzt (0.73 g) und für 3 h bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde eine eisgekühlte gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben und mit CHCl<sub>3</sub> (150 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit sat. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., H<sub>2</sub>O und sat. NaCl (je 100 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingeeengt. Nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie (Elutionsgradient: Hexan/EtOAc: 80:20 → 60:40, R<sub>f</sub>: 0.5) wurden 1.25 g (43 %) eines farblosen Feststoffes erhalten. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.65 (s, 2H, CO-CH=CH-CO), 4.63 – 4.45 (m, 1H, NH), 3.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Mal-CH<sub>2</sub>), 3.05 (s *br*, 2H, CH<sub>2</sub>-NH-Boc), 1.67 – 1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.34 (m, 13H, 2×CH<sub>2</sub>, -Boc), 1.33 – 1.18 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.91, 156.06, 134.13, 79.08, 40.52, 37.80, 29.99, 28.51, 26.43, 26.31.



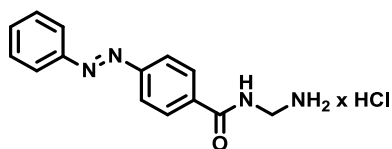


*Perfluorophenyl 4-(phenyldiazenyl)benzoate* (5): Zu einer Mischung von 4-(phenyldiazenyl)benzoesäure (1.59 g, 7.00 mmol) und TEA (2.50 mL, 18.2 mmol) in 32 mL THF wurde Perfluorophenyl 2,2,2-trifluoracetat (5.00 g, 17.8 mmol) in 18 mL trockenem THF tropfenweise hinzugegeben. Nach 2 h wurde die Mischung mit 120 mL DCM verdünnt und mit H<sub>2</sub>O gewaschen (2 mal á 30 mL), anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bis zu einem Volumen von 5 mL eingengt. Die Lösung wurde herunter gekühlt (7 °C), die erhaltenen Kristalle abfiltriert und mit Hexan gewaschen. Es konnten 1.45 g des Aktivesters gewonnen werden. Durch Umkristallisation des Filtrates konnte die Ausbeute auf 2.00 g (73 %) erhöht werden. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.35 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-*H*), 8.04 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-*H*), 8.01 – 7.96 (m, 2H, Ar-*H*), 7.62 – 7.47 (m, 3H, Ar-*H*); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 162.21, 156.28, 152.66, 143.29, 139.82, 136.44, 132.25, 131.97, 129.38, 128.47, 123.47, 123.19; <sup>19</sup>F NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -152.37 (d, *J* = 17.4 Hz), -157.75 (t, *J* = 21.7 Hz), -162.22 (dd, *J* = 21.6, 17.3 Hz).



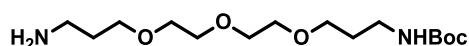
*(E)-N-(2-amino-2-oxoethyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamid* (7): Der Azobenzenaktivester 5 wurde in DMF (28 mL) und THF (10 mL) gelöst und zu einer Lösung von 2-Aminoacetamidhydrochlorid (1.86 g, 16.8 mmol) in DMF (84 mL) und TEA (4.7 mL, 34 mmol) getropft. Nach 3 h bei rt wurde mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert, die organische Phase wurde mit H<sub>2</sub>O, gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung, gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel wurde entfernt. Um die Ausbeute von ca. 200 mg zu steigern, wurde das in der wässrigen Phase gelöste Produkt in Hexan präzipitiert. Das Präzipitat wurde gefiltert und getrocknet. Das Produkt lag als orange-roter Feststoff vor. Ausbeute: 592 mg (38 %) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ausgewählte Daten): δ 8.86 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H; -CO-NH-CH<sub>2</sub>-), 8.13 – 8.08 (m, 2H; Ar-*H*), 7.99 – 7.90 (m, 4H; Ar-*H*), 7.67 – 7.58 (m, 3H; Ar-*H*), 7.42 (s, 2H; -NH<sub>2</sub>), 3.86 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H; -CH<sub>2</sub>).



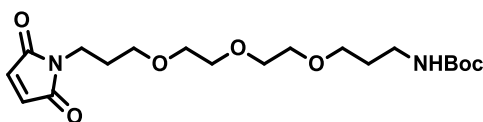


(*E*)-*N*-(2-aminoethyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamid hydrochloride (**8**):

(Bis(trifluoroacetoxy)iod)benzol (PIFA) (1.71 g, 2.7 mmol) wurde in DMSO (14 mL) gelöst, (*E*)-*N*-(2-amino-2-oxoethyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide (**7**) (592 mg, 2.1 mmol) und Wasser (3.8 mL) wurden zugeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei rt gerührt, anschließend in 1 M HCl gegeben und mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Die Azobenzenmoleküle lösten sich nicht vollständig in der wässrigen Phase und bildeten einen orangefarbenen Schaum. Dieser wurde von der wässrigen Phase getrennt und lyophilisiert. Das Produkt lag als orangeroter Feststoff und Mischung aus Molekül **7** und **8** vor (411 mg, davon 44 % **7** und 56 % **8**, die n/n-Berechnung wurde anhand des <sup>1</sup>H-NMR durchgeführt). Ausbeute: 230 mg (berechnet), 38 %. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) (ausgewählte Daten): δ 9.83 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 8.42 (s, 3H, NH<sub>2</sub>), 8.19 – 8.07 (m, 2H, Ar-*H*), 8.06 – 7.88 (m, 4H, Ar-*H*), 7.68 – 7.55 (m, 3H, Ar-*H*), 4.44 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

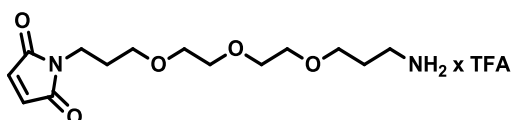


*tert*-butyl (3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)carbamate (**11**): Zu einer Lösung von 3,3'-((oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(propan-1-amine) (13.2 g, 60 mmol) in 1,4-Dioxan (120 mL) wurde Boc<sub>2</sub>O (2.2 g, 10 mmol) in 50 mL 1,4-Dioxan über 2 h zugetropft. Nach weiteren 16 h wurde das Lösemittel entfernt, der Rückstand wurde in 100 mL H<sub>2</sub>O suspendiert und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lsg. Gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurden 3.0 g eines farblosen Öles erhalten. Charakterisierung via <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie zeigte das Produkt sowie das doppelt geschützte Nebenprodukt in einem 2:1 Verhältnis. Daraus ließ sich eine Ausbeute von 57 % berechnen. Das Gemisch wurde ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.07 (d, *J* = 31.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.79 - 3.44 (m, 12H, CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 3.30 – 3.07 (m, 2H, BocNHCH<sub>2</sub>), 2.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 1.96 - 1.60 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, -Boc).



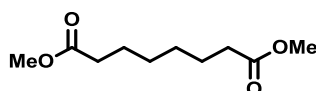
*tert*-butyl (3-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)carbamate (**12**): 1.43 g von *tert*-butyl (3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl) carbamate (**12**) (approx.: 3.0 mmol) wurden in einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung suspendiert und mit einem Eis-

bad herunter gekühlt, anschließend wurde *N*-Methoxycarbonylmaleimid zugegeben. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und die Mischung für weitere 45 min gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 40$  mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und bei vermindertem Druck eingengt. Das erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/EtOAc, 1:1;  $R_f=0.2$ ) und es konnten 1.16 g (97 %) des gewünschten Produktes erhalten werden.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.65 (s, 2H,  $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$ ), 4.95 (s, 1H, NH), 3.71 – 3.48 (m, 12H,  $6 \times \text{CH}_2$ ), 3.43 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H, Mal- $\text{CH}_2$ ), 3.18 (br t, 2H,  $\text{BocNHCH}_2$ ), 1.90 – 1.62 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.40 (s, 9H,  $-\text{Boc}$ ).

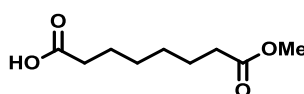


*1-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-1H-pyrrole-2,5-dione-trifluoroacetate* (13):

1.16 g (2.90 mmol) *tert*-butyl (3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl) carbamate (12) wurden in 11 mL DCM gelöst und auf 0 °C herunter gekühlt. Anschließend wurden 5.5 mL TFA tropfenweise addiert. Nach 2 h bei rt wurde das Lösemittel durch Coevaporation mit Toluol ( $3 \times 15$  mL) entfernt. Der Rückstand wurde mit  $\text{Et}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend getrocknet. Es konnten 1.14 g (98 %) eines braunen Öls gewonnen werden.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.68 (s, 2H,  $-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-$ ), 3.78 – 3.51 (m, 14H,  $6 \times \text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 3.44 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H, Mal- $\text{CH}_2$ ), 2.06 – 1.90 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.88 – 1.76 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).

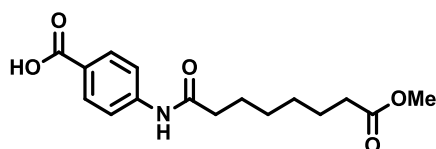


*Dimethyl octanedioate* (18): Korksäure (20 g, 115 mmol) wurde in MeOH (90 mL) gelöst, konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2 mL) wurde hinzugeben und die Mischung wurde für 16 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand auf Eis gegossen und mit  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 50$  mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit wässriger sat.  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 40$  mL) gewaschen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und eingengt. Es wurden 18.9 g (81 %) eines farblosen Öles erhalten.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.66 (s, 6H,  $2 \text{ CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 1.70 – 1.52 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 1.33 (s, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ ).

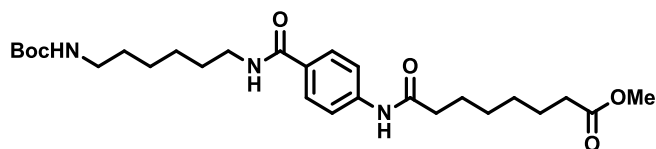


*8-methoxy-8-oxooctanoic acid* (19): Zu einer Lösung des Dimethylesters 18 (9.6 g, 47.5 mmol) in MeOH (15 mL) wurde KOH (2.65 g, 47.2 mmol) in MeOH (50 mL) getropft. Nach 16 h bei rt wurde

das Lösemittel entfernt, der erhaltene Rückstand wurde in H<sub>2</sub>O (50 mL) und Et<sub>2</sub>O (50 mL) gelöst und extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit HCl (13 %) angesäuert (pH 2) und anschließend extrahiert mit Et<sub>2</sub>O (2 x 50 mL). Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 50 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingengt. Aus dem erhaltenen Rückstand wurde der Monomethylester sukzessiv mit Hexan heraus gewaschen. Nach dem Entfernen des Lösemittels konnte das gewünschte Produkt als farbloses Öl erhalten werden. Ausbeute: (2.76 g, 31 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.65 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.32 (dt, *J* = 11.6, 7.5 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.68 – 1.53 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.39 – 1.26 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO).

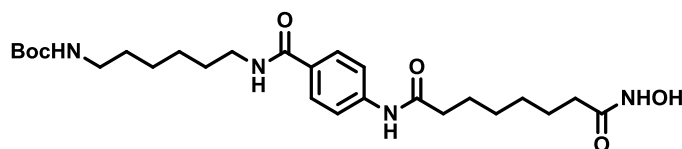


4-(8-methoxy-8-oxooctanamido)benzoic acid (**20**): Zu einer Lösung des Monomethylesters **19** (2.04 g, 10.8 mmol) in THF (2 mL) wurde DMF (85 µL) und Oxalylchlorid (1.11 mL, 13 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nach 1.5 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt. Das erhaltene Säurechlorid wurde in THF (2 mL) gelöst und eine Lösung von 4-Aminobenzoesäure (1.55 g, 10.8 mmol) in THF (8 mL) und TEA (1.81 mL, 13 mmol) wurde tropfenweise bei 0 °C hinzugegeben. Nach 16 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt, der erhaltene Feststoff wurde in H<sub>2</sub>O (150 mL) suspendiert und mit EtOAc (5 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl (100 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Die Lösung wurde bis zu einem Volumen von 100 mL bei 40 °C eingengt und auf –20 °C herunter gekühlt. Die ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert und getrocknet. Es wurden 1.7 g (51 %) eines farblosen Feststoffes erhalten. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.16 (s, 1H, CO<sub>2</sub>H), 8.00 – 7.53 (m, 4H, Ar-H), 3.57 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.39 – 2.22 (m, 4H, HNCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.55 (ddd, *J* = 14.4, 10.0, 7.2 Hz, 4H, HNCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29 (dd, *J* = 7.2, 3.5 Hz, 4H, HNCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.38, 171.83, 166.93, 143.43, 130.40, 124.80, 118.27, 118.19, 51.19, 39.52, 36.41, 33.26, 28.34, 28.27, 24.84, 24.35.



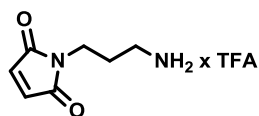
methyl 8-((4-((6-((tert-butoxycarbonyl)amino)hexyl)carbamoyl)phenyl)amino)-8-oxooctanoate (**21**): Zu einer Lösung von 4-(8-methoxy-8-oxooctanamido)benzoic acid (**20**) (550 mg, 1.79 mmol) in DMF (4.3 mL) wurde HOBt x H<sub>2</sub>O (329 mg, 2.15 mmol), EDC x HCl (412 mg, 2.15 mmol) und TEA (582 µL, 4.18 mmol) hinzugeben. Anschließend wurde *tert*-butyl (6-aminohexyl)carbamate (**1c**)

(387 mg, 1.79 mmol) in DMF (4.3 mL) tropfenweise hinzugegeben. Nach 16 h bei rt wurde EtOAc (250 mL) hinzugegeben und das Gemisch wurde mit 1M HCl (5 × 50 mL) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, EtOAc/n-hexane (3:1) (R<sub>f</sub> = 0.4). Ausbeute: 511 mg (57 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.94 (s, 1H, ArNH), 8.21 – 8.13 (m, 2H, BocCO<sub>2</sub>NH, NHCO<sub>2</sub>Ar), 7.79 – 7.59 (m, 4H, Ar-*H*), 3.57 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.45 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Ar), 3.23 (dd, *J* = 13.0, 6.8 Hz, 2H, BocNHCH<sub>2</sub>), 2.28 (dt, *J* = 18.8, 7.4 Hz, 4H, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.66 – 1.44 (m, 8H, BocNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Ar, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.41 – 1.34 (m, 9H, -*Boc*), 1.33 – 1.16 (m, 8H, BocNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Ar, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO): δ 173.58, 171.91, 166.16, 156.06, 142.15, 129.43, 128.25, 118.56, 79.27, 56.62, 36.90, 33.76, 29.96, 29.66, 28.81, 28.73, 26.71, 26.52, 25.30, 24.77.

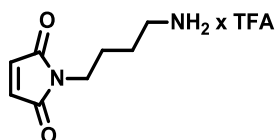


*tert*-butyl (6-(4-(8-(hydroxyamino)-8-oxooctanamido)benzamido)hexyl)carbamate (**22**): KOH (5.58 g, 99.4 mmol) wurde zu einer Lösung von NH<sub>2</sub>OH x HCl (6.74 g, 97 mmol) in MeOH (20 mL) bei 0 °C gegeben und 1 h bei rt gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat wurde zu einer Lösung von Methyl 8-((4-((6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexyl)carbamoyl)phenyl)amino)-8-oxooctanoate (**21**) (245 mg, 0.485 mmol) in MeOH (3 mL) bei 0 °C gegeben. KOH (272 mg, 4.85 mmol) wurden ergänzend dazugegeben. Nach 3 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand wurde in gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (35 mL) suspendiert. Ein pH-Wert von 5 wurde durch Zugabe von 6 M HCl eingestellt, das dabei ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und mit EtOAc gewaschen. Nach dem Trocknen im Hochvakuum konnten 122 mg (50 %) des Produktes gewonnen werden. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.41 (s, 1H, NHOH, ), 10.28 (s, 1H, NHOH), 8.34 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, BocCO<sub>2</sub>NH, NHCO<sub>2</sub>Ar), 7.74 (dd, *J* = 51.5, 8.7 Hz, 4H, Ar-*H*), 3.23 (dd, *J* = 13.1, 6.7 Hz, 2H, BocNHCH<sub>2</sub>), 2.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>NHOH), 1.57 (dd, *J* = 28.9, 21.9 Hz, 8H, BocNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Ar, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>NHOH), 1.38 (s, 9H, Boc-*H*), 1.29 (s, 8H, BocNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Ar, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>NHOH).

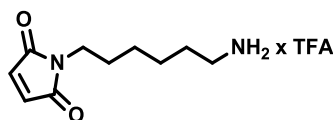
## 7.2 Aminobausteine



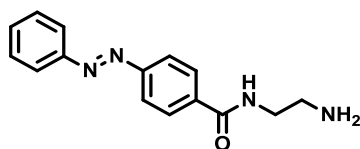
*1-(3-aminopropyl)-1H-pyrrole-2,5-dione 2,2,2-trifluoroacetate (4a)*: *tert*-butyl (3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propyl)carbamate (**3a**) (597 mg, 2.39 mmol) wurde in DCM (8 mL) gelöst und TFA (4 mL) wurde langsam unter Schutzgasatmosphäre zugegeben. Nach 2 h bei rt wurden zwei Teile Toluol (8 mL) hinzugefügt, das Reaktionsgemisch wurde eingeeengt und mit je 8 mL Toluol weitere zweimal coevaporiert. Anschließend wurde der Rückstand mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Das Produkt lag als farbloser Feststoff vor. Ausbeute: 623 mg (97 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7.81 (s, 2H; -NH<sub>2</sub>), 7.14 – 6.90 (m, 2H; -CO-CH=CH-CO-), 3.62 – 3.31 (m, 2H; -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2.78 (s, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1.87 – 1.66 (m, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).



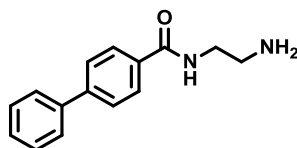
*1-(4-aminobutyl)-1H-pyrrole-2,5-dione-2,2,2-trifluoroacetate (4b)*: *tert*-butyl(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl)carbamate (**3b**) (100 mg, 0.96 mmol) wurde in DCM (2 mL) gelöst, TFA (1 mL) wurde tropfenweise zugegeben und 2 h, bei rt gerührt. Zwei Teile Toluol (2 mL) wurden hinzugefügt, das Reaktionsgemisch eingeeengt und mit Toluol zweimal coevaporiert. Anschließend wurde mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Das Produkt lag als ein farbloser Feststoff vor. Ausbeute: 108 mg (52 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.72 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 7.03 (s, 2H, -CH=CH-), 3.47 – 3.37 (m, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2.78 (dd, *J* = 11.9, 6.1 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1.63 – 1.40 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).



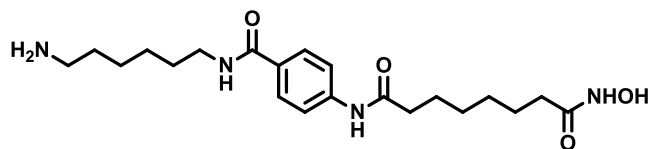
*1-(6-aminoethyl)-1H-pyrrole-2,5-dione trifluoroacetate (4c, AHMal)*: Zu einer Lösung von 613 mg (2.1 mmol) Boc-geschützten Aminoethylmaleimid **3c** in 6 mL DCM wurden 3 mL TFA hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Lösemittel mit Toluol (3 x 5 mL) coevaporiert. Der Rückstand wurde mit Et<sub>2</sub>O gewaschen und unter Vakuum getrocknet. 620 mg (quant) des gewünschten Produktes konnten erhalten werden. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.69 (s, 2H, -CO-CH=CH-CO-), 3.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, Mal-CH<sub>2</sub>), 2.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1.72 – 1.62 (m, 2H, Mal-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.57 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.15 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub>).



*2-aminoethyl-4-(phenyldiazenyl)benzamide* (**15**, **AZEA**): Zu einer Lösung von 2.80 mL (42.1 mmol) Ethylendiamin in 50 mL THF wurde Perfluorphenyl 4-(phenyldiazenyl)benzoat (**5**) (1.65 g, 4.21 mmol) in 30 mL THF tropfenweise hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Mischung mit 150 mL DCM verdünnt. Die organische Phase wurde mit H<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) und gesättigter NaCl (30 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösemittels konnten 1.11 g (98 %) eines roten Feststoffes erhalten werden. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.61 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 8.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.98 – 7.86 (m, 4H, Ar-H), 7.64 – 7.54 (m, 3H, Ar-H), 3.32 (dd, *J* = 12.1, 6.4 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 2.73 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 2.01 (s br, 2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 165.56, 153.18, 151.92, 136.90, 131.90, 129.48, 128.51, 122.70, 122.27, 43.26, 41.32; HPLC/MS (*t*<sub>r</sub>=9.95 min; ESI) gef.: 269.1 (M+H)<sup>+</sup>, ber.: 269.1.

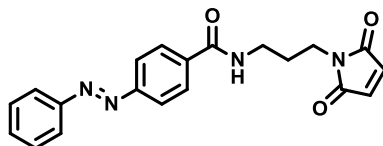


*N-(2-Aminoethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxamide* (**16**): Zu einer Lösung von 1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid (10 mmol, 1.98 g) in 2 mL THF wurden DMF 100 μL und 2 mL Oxalylchlorid zugeben. Nach 1.5 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt, der Rückstand wurde mit 60 mL DCM aufgenommen und Ethylendiamin (6.0 g, 100 mmol) wurde tropfenweise bei 0°C hinzugegeben. Nach 2 h bei 0°C und 16 h bei rt wurden 100 mL H<sub>2</sub>O zugeben und die Lösung wurde extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen, aufkonzentriert, in 5 mL DMF gelöst und in 100 mL Et<sub>2</sub>O mit 1 mL HOAc gefällt. Es konnten 400 mg (17 %) eines farblosen Feststoffes gewonnen werden. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.76 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 7.94 (m, 2H, Ar-H), 7.80 – 7.70 (m, 4H, Ar-H), 7.58 – 7.36 (m, 3H, Ar-H), 4.50 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.37 (dd, *J* = 11.6, 5.9 Hz, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 2.92 – 2.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); HPLC/MS (*t*<sub>r</sub>=8.82 min; ESI) gef.: 241.2 (M+H)<sup>+</sup>, ber.: 241.1 .

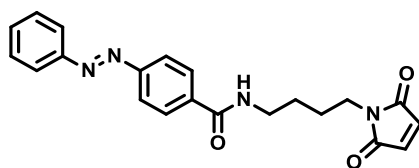


$N^1$ -(4-((6-aminohexyl)carbamoyl)phenyl)- $N^8$ -hydroxyoctanediamide (**17**): Zu einer Lösung von *tert*-butyl 4-(8-(hydroxyamino)-8-oxooctanamido)benzylcarbamate (**22**) (110 mg, 0.217 mmol) in DCM (1.3 mL) wurde tropfenweise TFA (1.2 mL) hinzugegeben und für 2 h bei rt gerührt. Anschließend wurde durch Coevaporation mit Toluol ( $3 \times 5$  mL) das Lösemittel entfernt. Der Rückstand wurde mit Et<sub>2</sub>O ( $2 \times 5$  mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 148 mg (quant.) eines farblosen Feststoffes erhalten. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.36 (s, 1H, OH), 10.22 (s, 1H, NHOH), 10.13 (s, 1H, ArNH), 8.34 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H, NHCOAr), 7.71 (dd,  $J = 38.3, 8.8$  Hz, 4H, Ar-H), 3.23 (dd,  $J = 12.8, 6.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NHCOAr), 2.76 (dd,  $J = 13.9, 6.7$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 2.37 – 2.24 (m, 2H, ArNHCOCH<sub>2</sub>), 1.93 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CONHOH), 1.66 – 1.39 (m, 8H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Ar, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>NHOH), 1.30 (dd,  $J = 8.3, 5.0$  Hz, 8H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>Ar, ArNHCO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>NHOH). HPLC/MS ( $t_r$ =7.96 min; ESI) gef.: 407.2 (M+H)<sup>+</sup>, ber.: 407.3.

### 7.3 Azobenzenenalkylmaleimide



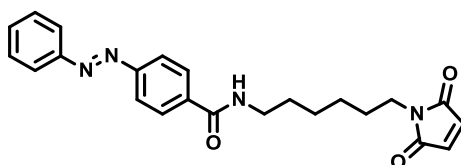
(*E*)-*N*-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide (**6a**): 1-(3-aminopropyl)1*H*-pyrrol-2,5-dione 2,2,2-Trifluoressigsäure-Salz (608 mg, 2.28 mmol) wurde in THF (14 mL) gelöst und TEA (950  $\mu$ l, 6.84 mmol) zugeben. (*E*)-perfluorphenyl 4-(phenyldiazenyl)benzoat (**5**) (1.79 g, 4.56 mmol) in THF (23 mL) wurde tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde 16 h, bei rt gerührt, erneut TEA (5 mL) zugegeben und bei 35 °C weitere 3 h gerührt. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand in  $\text{CHCl}_3$  gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser, 1 M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Im Folgenden wurde das Produkt über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, eingeeengt und durch Säulenchromatographie aufgereinigt (Laufmittel: EtOAc/Hexan 1:1,  $R_f$ : 0.42) Die Verbindung lag als orangeroter Feststoff vor. Ausbeute: 41 mg (7 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8.63 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H; -NH-), 8.06 – 8.02 (m, 2H, Ar-H), 7.97 – 7.90 (m, 4H, Ar-H), 7.67 – 7.57 (m, 3H, Ar-H), 7.02 (s, 2H; -CO-CH=CH-CO-), 3.49 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, -CO-N-CH<sub>2</sub>-), 3.31 – 3.24 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 1.85 – 1.77 (m, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  170.98, 165.38, 153.19, 151.89, 136.66, 134.46, 131.91, 129.48, 128.39, 122.66, 122.27, 36.98, 35.19, 27.99; HPLC/MS ( $t_r$  = 14.40 min; ESI) gef.: 363.2 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, ber.: 363.2 ; gef.: 385.2 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>, ber.: 385.1.



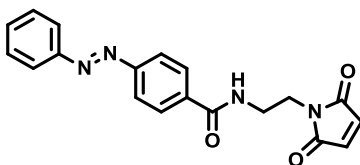
(*Z*)-*N*-(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)butyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide (**6b**): 1-(4-aminobutyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione 2,2,2-Trifluoressigsäure-Salz (104 mg, 0.37 mmol) wurde in THF (3 mL) gelöst und TEA (155  $\mu$ L, 1.1 mmol) zugeben. (*E*)-perfluorphenyl 4-(phenyldiazenyl)benzoat (**5**) (288 mg, 0.74 mmol), in THF (3 mL), wurden langsam zugetropft. Nach 16 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt und der Feststoff in  $\text{CHCl}_3$  (40 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent EtOAc / Hexan 1:4  $\rightarrow$  1:1,  $R_f$ : 0.4) Die Verbindung lag als orangeroter Feststoff vor. Ausbeute: 63 mg (45 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.94 (q,  $J$  = 8.6 Hz, 6H, Ar-H), 7.63 – 7.42 (m, 3H, Ar-H), 6.69 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 2H, -CO-CH=CH-CO-), 6.36 (s, 1H, NH), 3.68 –



3.41 (m, 4H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-), 1.84 – 1.51 (m, 4H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.98, 166.97, 154.39, 152.73, 136.48, 134.28, 131.69, 129.30, 128.05, 123.22, 123.08, 77.16, 39.78, 37.51, 26.84, 26.30; HPLC/MS (t<sub>r</sub> = 14.65 min; ESI) gef.: 377.1 (M+H)<sup>+</sup>, ber.: 377.2.

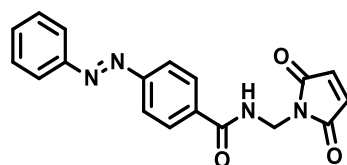


6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl-4-(phenyldiazenyl)benzamide (**6c**): N-(6-Aminohexyl)maleimid (**4c**) (85 mg, 0.283 mmol) wurde vorgelegt und in 1.4 mL THF und 125 μL TEA (0.900 mmol) gelöst. Perfluorphenyl 4-(phenyldiazenyl)benzoat (**5**) (222 mg, 0.57 mmol) wurde mit 1.4 mL THF gelöst und tropfenweise zugeben. Nach 16 h wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand mit 25 mL CHCl<sub>3</sub> aufgenommen mit H<sub>2</sub>O, 1 M HCl und gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingengt. Nach der säulenchromatischen Aufreinigung (Eluent: EtOAc:Hexan: 1:4 → 1:1; R<sub>f</sub>: 0.1 → 0.5) wurden 70 mg (61 %) eines orangefarbenen Feststoffes erhalten. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.99 – 7.87 (m, 6H, Ar-H), 7.64 – 7.42 (m, 3H, Ar-H), 6.66 (s, 2H, -CO-CH=CH-CO-), 6.49 (t, *J* = 15.6 Hz, 1H, NH), 3.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, Mal-CH<sub>2</sub>), 3.44 (dd, *J* = 13.0, 6.9 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 1.67 – 1.55 (m, 4H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-), 1.46 – 1.29 (m, 4H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.98, 166.92, 154.25, 152.66, 136.66, 134.15, 131.62, 129.24, 128.02, 123.16, 122.97, 40.02, 37.64, 29.52, 28.45, 26.30, 26.26; HPLC/MS (t<sub>r</sub> = 15.55 min; ESI) gef.: 405.2 (M+H)<sup>+</sup>, ber.: 405.2.



(*E*)-N-(2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide (**6d**): Ammonoethylmaleimid Hydrochlorid (150 mg, 0.85 mmol) wurde in THF (4 mL) gelöst und TEA (350 μL, 2.5 mmol) zugeben. (*E*)-Perfluorphenyl 4-(phenyldiazenyl)benzoat (666 mg, 1.70 mmol) wurde in THF (4 mL) gelöst und langsam zugetropft. Nach 16 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt, der Feststoff in CHCl<sub>3</sub> gelöst und anschließend mit H<sub>2</sub>O, 1 M HCl und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingengt und durch säulenchromatographisch aufgereinigt (Elution mit Gradienten: Hexan / EtOAc: 1:4 → 1:1, R<sub>f</sub>: 0.56). Das Produkt lag als orangefarbener Feststoff vor. Ausbeute: 223 mg (82 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.73 (t, *J* = 6.0 Hz,

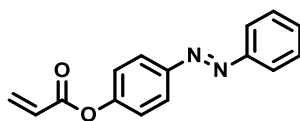
1H, NH), 8.04 – 7.85 (m, 6H, Ar-H), 7.70 – 7.51 (m, 3H, Ar-H), 7.00 (s, 2H, -CO-CH=CH-CO-), 6.26 (s, 1H, Ar-H), 3.66 – 3.55 (m, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3.55 – 3.39 (m, 3H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171.04, 165.76, 153.24, 151.89, 136.61, 134.51, 131.92, 129.49, 128.35, 122.67, 122.27, 39.52, 37.71, 37.10; HPLC/MS (*t<sub>r</sub>* = 14.0 min; ESI) gef.: 349.1 (M+H)<sup>+</sup>, ber.: 349.1.



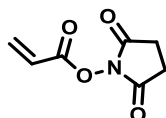
(*E*)-*N*-((2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)methyl)-4-(phenyldiazenyl)benzamide (**6e**):

HOBt × H<sub>2</sub>O (166 mg, 1.08 mmol), DIPEA (371 μL, 2.17 mmol) und EDC × HCl (208 mg, 1.09 mmol) wurden in DMF (50 mL) gelöst und unter Schutzatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Das nicht aufgereinigte (*Z*)-4-oxo-4-(((4-((*E*)-phenyldiazenyl)benzamido) methyl)amino)but-2-enoic acid wurde in DMF (15 mL) gelöst und mit einer Flussrate von 15 mL/h zu der Reaktionsmischung getropft. Nach 16 h wurde die Reaktionsmischung auf 10 mL eingengt und in CHCl<sub>3</sub> (50 mL) gelöst. Die organische Phase wurde mehrmals mit H<sub>2</sub>O und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Lösemittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Elutionsmittel: Hexan / EtOAc: 1:1, *R<sub>f</sub>*: 0.38). Das Produkt lag als orangeroter Feststoff vor. Ausbeute: 62 mg (27 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.16 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, -NH-), 8.06 – 8.03 (m, 2H, Ar-H), 7.97 – 7.90 (m, 4H, Ar-H), 7.65 – 7.58 (m, 3H, Ar-H), 7.08 (s, 2H, -CO-CH=CH-CO-), 5.04 (dd, *J* = 12.3, 5.7 Hz, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-N-); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 170.08, 165.28, 153.46, 151.89, 135.59, 134.80, 131.99, 129.50, 128.72, 122.70, 122.29, 42.69, 39.52; HPLC/MS (*t<sub>r</sub>* = 14.10 min; ESI) gef.: 335.1 (M+H)<sup>+</sup>, ber.: 335.1.

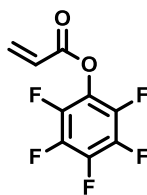
## 7.4 Monomere



4-(phenyldiazenyl)phenyl acrylate (**9**, AZAA): In 60 mL Et<sub>2</sub>O und 9.0 mL TEA wurde Hydroxyazobenzen (8.17 g; 41.2 mmol) gelöst und auf 0°C temperiert. Zu dieser Lösung wurde tropfenweise Acryloylchlorid (4.0 mL; 49.5 mmol) hinzugegen. Nach 3.5 h Reaktionsdauer wurde das Lösemittel entfernt, der Rückstand wurde mit 100 mL DCM aufgenommen, mit H<sub>2</sub>O (2 x 100 mL) und gesättigter NaCl-Lsg. (100 mL), gewaschen. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wurde mit 14 mL einer siedenden 50%igen EtOH-Lsg. behandelt, anschließend auf 0 °C herunter gekühlt und filtriert. Es konnten 10.3 g (99 %) eines roten Feststoffes gewonnen werden. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.03 – 7.90 (m, 4H, Ar-H), 7.58 – 7.45 (m, 3H, Ar-H), 7.36 – 7.29 (m, 2H, Ar-H), 6.66 (dd, *J* = 17.3, 1.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 6.37 (dd, *J* = 17.3, 10.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 6.06 (dd, *J* = 10.4, 1.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164.25, 152.69, 150.40, 133.08, 131.17, 129.20, 127.84, 124.18, 122.98, 122.28.



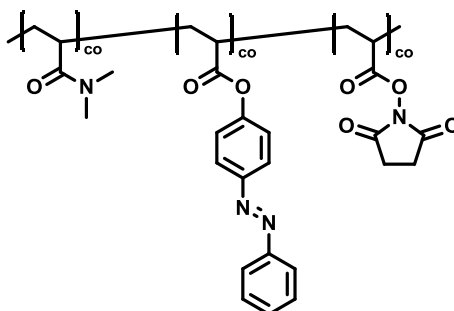
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl acrylate (**10**, NAS): *N*-Hydroxysuccinimid (7.50 g; 65.2 mmol) wurde in 110 mL CHCl<sub>3</sub> und 11 mL (80.6 mmol) TEA gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und tropfenweise mit Acryloylchlorid (6.4 mL; 80.6 mmol) versetzt und nach der Zugabe langsam auf rt erwärmt. Nach 3 h Reaktionsdauer wurde die organische Lösung mit H<sub>2</sub>O (3 x 50 mL) und gesättigter NaCl-Lsg. (50 mL) gewaschen, anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingengt. Das erhaltene braune Öl wurde in 6 mL Hexan:EtOAc (1:1) umkristallisiert. Die Kristalle wurde filtriert und zweimal mit 30 mL Hexan:EtOAc (4:1) und je einmal mit 30 mL Hexan:EtOAc (9:1) und 30 mL Hexan gewaschen. 6.21 g (56 %) des gewünschten Produktes konnten als hellgelbe Kristalle gewonnen werden. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.69 (dd, *J* = 17.2, 1.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 6.31 (dd, *J* = 17.2, 10.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 6.15 (dd, *J* = 10.7, 1.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 2.84 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.17, 161.15, 136.23, 123.05, 25.70.



*Perfluorophenyl acrylate* (**14**, **PFPA**): Pentafluorophenol (22.0 g, 120 mmol) und TEA (20 mL, 143 mmol) wurden in 140 mL Et<sub>2</sub>O gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C herunter gekühlt und mit frisch destillierten Acryloylchlorid versetzt. Nach der Zugabe wurde das Eisbad entfernt und für 2 h bei rt gerührt. Anschließend wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit Et<sub>2</sub>O gewaschen. Das Filtrat wurde eingeeengt und säulenchromatographisch gereinigt. (R<sub>f</sub> (Hexan): 0.60). Es konnten 20.4 g (72 %) eines farblosen Öles erhalten werden. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.72 (dd, *J* = 17.2, 1.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 6.37 (dd, *J* = 17.2, 10.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 6.17 (dd, *J* = 10.5, 1.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 161.81, 143.01, 141.38, 139.78, 139.63, 138.03, 136.24, 135.58, 125.52; <sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -152.72 (d, *J* = 17.1 Hz, 2F), -158.14 (t, *J* = 21.6 Hz, 1F), -162.24 – -162.85 (m, 2F).

## 7.5 Polymersynthesen

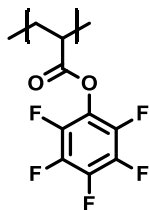
### 7.5.1 DMAA-AZEA-NAS Copolymere



**P[DMAA-AZAA-NAS]**

Die Monomere **9** (AZAA), **10** (NAS) und Dimethylacrylamid wurden mit dem Radikalstarter AIBN in einem Verhältnis von 100:0.4 eingewogen und in trockenen DMF gelöst ( $c=2$  mol/L). Die orangefarbene Lösung wurde durch vier *freeze-pump-thaw* Zyklen entgast. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in ein Ölbad (70 °C) gesetzt und für 18 h gerührt. Danach wurde die Lösung heruntergekühlt und in der 20-fachen Menge Et<sub>2</sub>O gefällt. Die Präzipitate wurde zentrifugiert, dekantiert, in MeOH gelöst und erneut zweimal in der 20-fachen Menge Et<sub>2</sub>O gefällt. Die Rückstände wurden nach dem Zentrifugieren und dem Dekantieren im Hochvakuum getrocknet. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.30 – 7.30 (*br m*, Ar-*H*), 3.30 – 2.20 (*br*, CH<sub>3</sub>, CO-CH, CO-CH<sub>2</sub>), 2.20 – 1.00 (*br*, CO-CH-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.57, 173.98, 168.97, 152.64, 150.41, 131.11, 129.18, 124.12, 122.93, 122.53, 37.25, 35.93, 25.75.

## 7.5.2 Polypentafluorophenylacrylat



*Polypentafluorophenylacrylate* (exemplarisch für **PPFPA 1**): 20 g Pentafluorophenylacrylat wurde in 50 mL 1,4-dioxane gelöst. 51.5 mg Benzylthiobenzoat und 4.5 mg AIBN wurden hinzugeben. Die rosa Lösung wurde durch vier *freeze-pump-thaw* Zyklen entgast. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in ein Ölbad (75 °C) gesetzt und für 22 h gerührt. Die klare Lösung wurde auf rt herunter gekühlt und in Hexan (450 mL) gefällt und abfiltriert. Der Feststoff wurde mit THF aufgenommen und erneut in Hexan gefällt. Der farblose Feststoff wurde abfiltriert und im Ofen bei 40 °C getrocknet. Es konnten 11.5 g (56 %) des Aktivesterpolymers erhalten werden.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.10 (*br s*, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ ), 2.51 (*br s*, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ ), 2.13 (*br s*, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  169.99, 142.67, 141.65, 139.75, 138.26, 136.37, 40.67, 34.86;  $^{19}\text{F}$  NMR (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -153.23 (*s*, 2F), -156.87 (*s*, 1F), -162.28 (*s*, 2F).

### 7.5.3 Polymeranaloge Umsetzungen

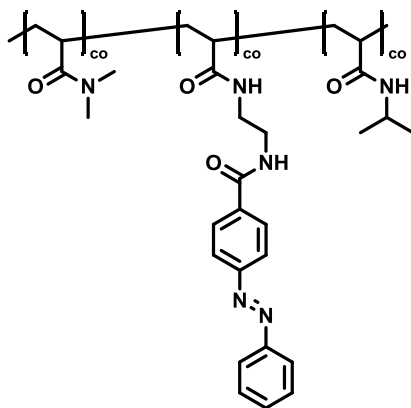
#### 7.5.3.1 Umsetzungen an P[DMAA-AZAA-NAS]

Durch Umsetzungen an diesen Aktivesterpolymeren wurden die Polymere **P[DMAA-AZAA-Mal] 1 – 4** dargestellt.

Hierfür wurden die Polymere **P[DMAA-AZAA-NAS]** in THF gelöst (20 mg/mL) und mit dem Aminobausteinen (3 eq.) und DIEA (7 eq.) versetzt. Nach 16 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen und mit 1 M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wurde mit MeOH wieder aufgenommen und in der 50-fachen Menge Et<sub>2</sub>O zweimal erneut gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet.

#### 7.5.3.2 Umsetzungen an PPFPA 1

##### Variante a: Darstellung P[DMAA-AZEA-NIPAAm] 1–8



**P[DMAA-AZEA-NIPAAm]**

Das Aktivesterpolymer wurde in trockenen THF gelöst (0.2 g/mL), anschließend wurden die Aminobausteine **15** (AZEA), Isopropylamin (1 M Lösung in THF) sowie TEA (2.2 eq. pro mol Pentafluorphenylacrylat), hinzugeben. Nach 3 h wurden die verbliebenen Aktivestergruppen mit 2.5 eq. Dimethylamin (2 M Lösung in THF) abgesättigt. Nach weiteren 16 h bei rt wurde das Lösemittel entfernt, der Rückstand in ca. 20 mL H<sub>2</sub>O suspendiert und gegen 5 L H<sub>2</sub>O (Wasserwechsel nach 3 h, 6 h und 21 h) dialysiert. Die Polymerlösung wurde anschließend bis zur Trockene lyophilisiert.

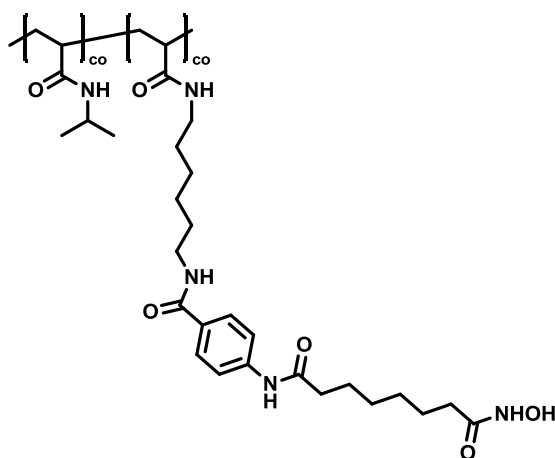
##### Variante b: Testreaktion im NMR-Röhrchen

16 mg (2 eq) **PPFPA** wurde in 350  $\mu$ L THF-*d*<sub>8</sub> gelöst und in ein NMR-Probenröhrchen überführt, anschließend wurden 10 mg **4c** (AHMal, 1 eq.) in 350  $\mu$ L und 6.8  $\mu$ L TEA (2 eq.) gelöst und zu dem PPFPA gegeben und invertiert.

### Variante c: Darstellung P[DMAA-AZEA-AHMal] 1–5

PPFPA wurde in trockenen THF gelöst (0.2 g/mL), anschließend wurden 0.7–0.85 eq. pro Aktivester Dimethylamin (2 M Lösung in THF) und TEA (1 eq. pro DMA) hinzugegeben. Nach 3 h wurden (0.05–0.2 eq pro Aktivester) **4c** (AHMal) hinzugegeben und 2 eq. TEA pro AHMal, nach weiteren 3 h wurde AZEA (0.20–0.25 eq pro Aktivester) und TEA (2 eq. pro AZEA) hinzugegeben und die Mischung für 16 h gerührt. Für P[DMAA-AZEA-AHMal] **1** und **2**: Die Lösung wurde eingeeengt, in MeOH aufgenommen und in 50 mL Et<sub>2</sub>O gefällt. Für P[DMAA-AZEA-AHMal] **3–5**: Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O verdünnt, gegen H<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend lyophilisiert.

### Variante d: Darstellung P[NIPAAm-AHSAHA]



P[NIPAAm-AHSAHA]

PPFPA (100 mg) wurde in 1.5 mL trockenen THF gelöst, **17** (AHSAHA) (11 mg; 21  $\mu$ mol) wurde in 0.5 mL DMSO gelöst und zu der Polymerlösung gegeben, anschließend wurde TEA (7.3  $\mu$ L, 53  $\mu$ mol) hinzugegeben. Nach 16 h bei rt wurden die restlichen Aktivestergruppen durch die Zugaben von Isopropylamin (90  $\mu$ L, 1.05 mol) und TEA (233  $\mu$ L, 1.68 mmol) abgesättigt. Nach weiteren 16 h wurde die Lösung gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.00 – 7.60 (*br m*, Ar-H), 4.01 (*br s*, CH-CH<sub>3</sub>), 3.80 – 3.00 (*br, m*, CO-CH, CO-CH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>), 2.60 – 0.80 (*m*, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH-CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.55, 174.19, 42.50, 41.33, 36.44, 36.30, 35.71, 35.13, 34.79, 29.66, 22.58; M<sub>n</sub>: 12.0 kDa; PDI = 1.8.



### 7.5.3.3 Umsetzungen an PPFA 2

Durch Umsetzung an **PPFA 2** wurden die Polymere **P[DMAA-AZEA-AHMal] 6–11**, **P[DMAA-AZEA] 6** und **P[DMAA-AHMal] 1** dargestellt. Die Umsetzungen an **PPFA 2** wurden über mehrere Stufen durchgeführt, jede Zwischenstufe wurde aufgearbeitet und charakterisiert. Anschließend wurden die Zwischenstufen weiter verwendet. Die Synthesen für **P[DMAA-AZEA] 6** (Zugabe von **15** statt **4c** in der 2. Stufe) und **P[DMAA-AHMal] 1** wurden analog durchgeführt, jedoch bereits nach der zweiten Stufe aufgearbeitet und dialysiert.

#### 1. Stufe: Darstellung **P[PPFA-DMAA]**

2.5 g **PPFA** wurde in 10 mL trockenem THF gelöst, anschließend wurden 0.75–0.85 eq. pro Aktivester Dimethylamin (2 M Lösung in THF) und TEA (1 eq. pro DMA) hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Lösung in 200 mL Hexan gefällt, zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und erneut zweimal gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet.

#### 2. Stufe: Darstellung **P[PPFA-DMAA-AHMal]**, **P[DMAA-AZEA] 6**, und **P[DMAA-AHMal] 1**

Die 1. Stufe **P[PPFA-DMAA]** wurde in THF (0.075 g/mL) gelöst anschließend wurde 0.01–0.15 eq. **4c** (bezogen auf die Summe von DMAA und PPFA) und 2 eq. TEA pro **4c** wurde zugegeben. Nach 3 h wurde die Lösung in der 200 mL Hexan gefällt, zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und erneut zweimal gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet.

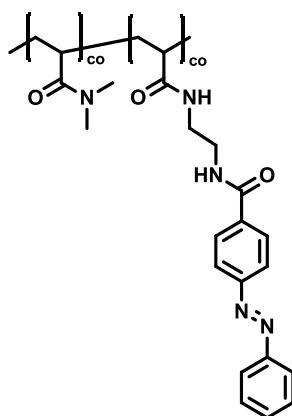
#### 3. Stufe: Darstellung **P[DMAA-AZEA-AHMal]**

Die 2. Stufe **P[PPFA-DMAA-AHMal]** wurde in THF (0.075 g/mL) gelöst. **15** (2.5 eq pro berechneten Aktivester) und TEA (2 eq. pro **15**) wurden hinzugegeben und die Mischung für 16 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung dreimal in der 20-fachen Menge Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet. Der Rückstand wurde in H<sub>2</sub>O und THF gelöst, gegen H<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend lyophilisiert.

#### 7.5.3.4 Umsetzungen an PPFPA 3

Durch Umsetzungen an **PPFPA 3** wurden die Polymere **P[AZEA-DMAA] 1–5** und **7–8**, sowie **PNIPAAm 1** und **P[DMAA-AHMal] 1** dargestellt.

##### **P[DMAA-AZEA]**



**P[DMAA-AZEA]**

Diese Polymere wurden in einer Stufe dargestellt **P[DMAA-AZEA] 1–5**, sowie über zwei Synthesestufen, **P[DMAA-AZEA] 7–8**, mit Aufarbeitung der Zwischenstufe.

##### **P[DMAA-AZEA] 1–5**

**PPFPA** wurde in trockenen THF gelöst (0.2 g/mL), anschließend wurden 0.1–0.15 eq. pro Aktivester **15 (AZEA)** und TEA (1 eq. pro **AZEA**) hinzugegeben. Nach 16 h wurden 1.7–1.8 eq (pro Aktivester) Dimethylamin (2 M in THF) und 1 eq. TEA pro Dimethylamin addiert. Nach weiteren 16 h wurde die Lösung eingeeengt, in MeOH aufgenommen und in der 50-fachen Menge Et<sub>2</sub>O gefällt. Anschließend wurde das Präzipitat zentrifugiert, dekantiert, getrocknet und weitere zweimal in Et<sub>2</sub>O gefällt. Abschließend wurde der Rückstand in H<sub>2</sub>O suspendiert, gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

---

## P[DMAA-AZEA] 7–8

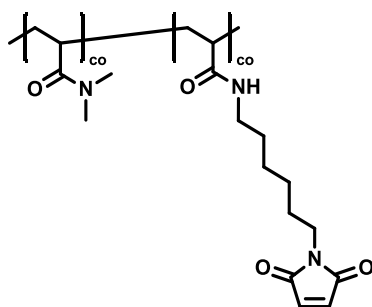
### 1. Stufe: Darstellung P[PFPA-DMAA]

1.25 g **PPFPA** wurde in 5 mL trockenem THF gelöst, anschließend wurde Dimethylamin (2 M Lösung in THF, 0.85–0.90 eq. pro Aktivester) und TEA (1 eq. pro DMA) hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Lösung in 100 mL Hexan gefällt, zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und erneut zweimal gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet.

### 2. Stufe: Darstellung P[DMAA-AZEA]

Die 1. Stufe **P[PFPA-DMAA]** wurde in THF (0.075 g/mL) gelöst, anschließend wurde **15** (**AZE-A**, 1.5 eq bezogen auf die bestimmte Menge an **PPFPA**) und 2 eq. TEA pro **15** zugegeben. Nach 16 h wurde die Lösung in der 120 mL Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und erneut zweimal gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet. Das Präzipitat wurde danach in H<sub>2</sub>O gelöst, dialysiert und lyophilisiert.

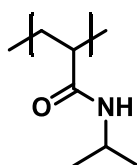
## P[DMAA-AHMal] 1



### P[DMAA-AHMal] 1

**PPFPA** (400 mg; 1.68 mmol) wurde in 5 mL trockenem THF gelöst, anschließend wurde 0.8 eq. Dimethylamin (2 M Lösung in THF) pro Aktivester und TEA (1.34 mmol; 1 eq. pro DMA) hinzugegeben. Nach 16 h wurde die Lösung eingengt und mit 5 mL THF wieder gelöst, anschließend wurde **4c** (150 mg; 0.50 mmol) und TEA (1 mmol) zugegeben. Nach 16 h bei rt gerührt wurde die Lösung in 100 mL Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und erneut zweimal in Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet. Nachfolgend wurde der Feststoff gelöst und gegen H<sub>2</sub>O dialysiert. Es konnten 120 mg (56 %) eines farblosen Feststoffes gewonnen werden. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.69 (s, 2H, CH=CH), 3.55 – 3.41 (m, 1H, NCH<sub>2</sub>), 3.40 – 2.00 (m), 1.94 – 1.40 (m), 1.29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); M<sub>n</sub>: 10.3 kDa; PDI = 3.1.

## PNIPAAm 1



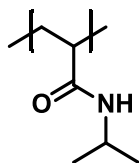
### PNIPAAm 1

**PPFPA** (750 mg; 3.15 mmol) wurde in 3 mL trockenem THF gelöst, anschließend wurde Isopropylamin (530 μL; 6.15 mmol) und TEA (877 μL; 6.3 mmol) hinzugegeben. Nach 16 h wurde die Lösung in 120 mL Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und erneut zweimal in Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert, dekantiert und getrocknet. Nachfolgend wurde der Feststoff gelöst und gegen H<sub>2</sub>O dialysiert. Es konnten 356 mg (76 %) eines farblosen Feststoffes gewonnen werden. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.82 (s br, 1H, NH), 3.99 (s, 1H, NHCH), 2.70–1.30 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, COCH), 1.14 (s, 13H, 2 × CH<sub>3</sub>); M<sub>n</sub>: 19.4 kDa; PDI = 1.5.

#### 7.5.4 Poly(*N*-Isopropylacrylamid)

PNIPAAm 1 wurde durch polymeranaloge Umsetzung an PPFPA 3 dargestellt.

##### PNIPAAm 2



PNIPAAm 2

*N*-Isopropylacrylamid (1.0 g; 8.8 mmol) und AIBN (3.0 mg; 18.3  $\mu$ mol) wurden in 6.0 mL DMF gelöst. Die Lösung wurde durch vier *freeze-pump-thaw* Zyklen entgast, anschließend wurde das Reaktionsgefäß in ein Ölbad (75 °C) gesetzt und die Mischung für 18 h gerührt. Das Polymer wurde in 200 mL Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert, abdekantiert und getrocknet. Nachfolgend wurde das Polymer in H<sub>2</sub>O gelöst und gegen H<sub>2</sub>O dialysiert (MWCO 3500). Nach Gefriertrocknung konnte das Produkt (0.83 g; 83 %) als farbloser Feststoff gewonnen werden. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  3.96 (s, 1H, CH), 2.08 (s, 1H, COCH), 1.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.15 (s, 6H, 2  $\times$  CH<sub>3</sub>).

---

## 8 Literatur

---

1. Ward MA, Georgiou TK (2011) Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers* 3:1215–1242.
2. Aguilar M, Elvira C, Gallardo A, Vazquez B, Roman J (2007) Smart polymers and their applications as biomaterials. *Topics in tissue engineering* 3:1–27.
3. Gil ES, Hudson SM (2004) Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science* 29:1173–1222.
4. Stuart MAC et al. (2010) Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials* 9:101–113.
5. Bandara HD, Burdette SC (2012) Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chemical Society Reviews* 41:1809–1825.
6. Hartley G (1937) The cis-form of azobenzene. *Nature* 140:281.
7. Kröger R, Menzel H, Hallensleben ML (1994) Light controlled solubility change of polymers: Copolymers of N, N-dimethylacrylamide and 4-phenylazophenyl acrylate. *Macromolecular Chemistry and Physics* 195:2291–2298.
8. Ding Z et al. (1999) Temperature control of biotin binding and release with A streptavidin-poly (N-isopropylacrylamide) site-specific conjugate. *Bioconjugate Chemistry* 10:395–400.
9. Stayton PS et al. (1995) Control of protein-ligand recognition using a stimuli-responsive polymer. *Letters to Nature* 378:472–474.
10. Shimoboji T et al. (2002) Photoresponsive polymer-enzyme switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:16592–16596.
11. Hoffman AS, Stayton PS (2007) Conjugates of stimuli-responsive polymers and proteins. *Progress in Polymer Science* 32:922–932.
12. Theato P, Sumerlin BS, O'Reilly RK, Epps III TH (2013) Stimuli responsive materials. *Chemical Society Reviews* 42:7055–7056.
13. Liu F, Urban MW (2010) Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers. *Progress in Polymer Science* 35:3–23.
14. Klouda L, Mikos AG (2008) Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68:34–45.
15. Zhu C, Ninh C, Bettinger CJ (2014) Photoreconfigurable Polymers for Biomedical Applications: Chemistry and Macromolecular Engineering. *Biomacromolecules*.

- 
16. De las Heras Alarcón C, Pennadam S, Alexander C (2005) Stimuli responsive polymers for biomedical applications. *Chemical Society Reviews* 34:276–285.
  17. Cabane E, Zhang X, Langowska K, Palivan CG, Meier W (2012) Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. *Biointerphases* 7:1–27.
  18. Heskins M, Guillet JE (1968) Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science—Chemistry* 2:1441–1455.
  19. Scarpa JS, Mueller DD, Klotz IM (1967) Slow hydrogen-deuterium exchange in a non-. alpha.-helical polyamide. *Journal of the American Chemical Society* 89:6024–6030.
  20. Roy D, Brooks WL, Sumerlin BS (2013) New directions in thermoresponsive polymers. *Chemical Society Reviews*.
  21. Ito D, Kubota K (1997) Solution properties and thermal behavior of poly (N-n-propylacrylamide) in water. *Macromolecules* 30:7828–7834.
  22. Maeda Y, Nakamura T, Ikeda I (2001) Changes in the hydration states of poly (N-alkylacrylamide) s during their phase transitions in water observed by FTIR spectroscopy. *Macromolecules* 34:1391–1399.
  23. Idziak I, Avoce D, Lessard D, Gravel D, Zhu X (1999) Thermosensitivity of aqueous solutions of poly (N, N-diethylacrylamide). *Macromolecules* 32:1260–1263.
  24. Fischer F, Zufferey D, Tahoces R (2011) Lower critical solution temperature in superheated water: the highest in the poly (N, N-dialkylacrylamide) series. *Polymer International* 60:1259–1262.
  25. Zhang Y et al. (2007) Effects of Hofmeister anions on the LCST of PNIPAM as a function of molecular weight. *The Journal of Physical Chemistry C* 111:8916–8924.
  26. Du H, Wickramasinghe R, Qian X (2010) Effects of salt on the lower critical solution temperature of poly (N-isopropylacrylamide). *The Journal of Physical Chemistry B* 114:16594–16604.
  27. He J, Tremblay L, Lacelle S, Zhao Y (2014) How can photoisomerization of azobenzene induce a large cloud point temperature shift of PNIPAM? *Polymer Chemistry*.
  28. Xia Y, Yin X, Burke NA, Stöver HD (2005) Thermal response of narrow-disperse poly (N-isopropylacrylamide) prepared by atom transfer radical polymerization. *Macromolecules* 38:5937–5943.
  29. Jeong NS et al. (2012) Polymers with molecular weight dependent LCSTs are essential for cooperative behaviour. *Polymer Chemistry* 3:794–799.
  30. Delmas G, Patterson D (1970) in *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, pp 1–8.

- 
31. Hoffman AS et al. (2000) Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *Journal of Biomedical Materials Research* 52:577–586.
  32. Mayer G, Heckel A (2006) Biologically active molecules with a “light switch.” *Angewandte Chemie International Edition* 45:4900–4921.
  33. Hirshberg Y (1950) Photochromie dans la serie de la bianthrone. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'academie des Sciences* 231:903–904.
  34. Dugave C, Demange L (2003) Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications. *Chemical Reviews* 103:2475–2532.
  35. Velema WA, Szymanski W, Feringa BL (2014) Photopharmacology: beyond proof of principle. *Journal of the American Chemical Society* 136:2178–2191.
  36. Willner I, Rubin S (1996) Control of the structure and functions of biomaterials by light. *Angewandte Chemie International Edition* 35:367–385.
  37. Brieke C, Rohrbach F, Gottschalk A, Mayer G, Heckel A (2012) Light-Controlled Tools. *Angewandte Chemie International Edition* 51:8446–8476.
  38. Fliegl H, Köhn A, Hättig C, Ahlrichs R (2003) Ab initio calculation of the vibrational and electronic spectra of trans-and cis-azobenzene. *Journal of the American Chemical Society* 125:9821–9827.
  39. Irie M, Menju A, Hayashi K (1979) Photoresponsive polymers. Reversible solution viscosity change of poly (methyl methacrylate) having spirobenzopyran side groups. *Macromolecules* 12:1176–1180.
  40. Blair HS, Pague HI, Riordan JE (1980) Photoresponsive effects in azo polymers. *Polymer* 21:1195–1198.
  41. Kungwatchakun D, Irie M (1988) Photoresponsive polymers. Photocontrol of the phase separation temperature of aqueous solutions of poly-[N-isopropylacrylamide-co-N-(4-phenylazophenyl) acrylamide]. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* 9:243–246.
  42. Chiefari J et al. (1998) Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process. *Macromolecules* 31:5559–5562.
  43. Nicolas J, Mantovani G, Haddleton DM (2007) Living Radical Polymerization as a Tool for the Synthesis of Polymer-Protein/Peptide Bioconjugates. *Macromolecular Rapid Communications* 28:1083–1111.
  44. Boyer C et al. (2009) Bioapplications of RAFT polymerization. *Chemical Reviews* 109:5402–5436.
  45. Chong Y et al. (2003) Thiocarbonylthio Compounds [SC (Ph) SR] in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization). Role of



- the Free-Radical Leaving Group (R). *Macromolecules* 36:2256–2272.
46. Günay KA, Theato P, Klok H-A (2013) Standing on the shoulders of Hermann Staudinger: Post-polymerization modification from past to present. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 51:1–28.
  47. Batz H-G, Franzmann G, Ringsdorf H (1972) Model reactions for synthesis of pharmacologically active polymers by way of monomeric and polymeric reactive esters. *Angewandte Chemie International Edition* 11:1103–1104.
  48. Religio P et al. (2013) Biotin-end-functionalized highly fluorescent water-soluble polymers. *Polymer Chemistry* 4:2968–2981.
  49. Chung H, Grubbs RH (2012) Rapidly Cross-Linkable DOPA Containing Terpolymer Adhesives and PEG-Based Cross-Linkers for Biomedical Applications. *Macromolecules* 45:9666–9673.
  50. Chang C et al. (2011) Thermo-responsive shell cross-linked PMMA-b-P(NIPAAm-co-NAS) micelles for drug delivery. *Int J Pharm* 420:333–40.
  51. Qiao J, Mu X, Qi L, Deng J, Mao L (2013) Folic acid-functionalized fluorescent gold nanoclusters with polymers as linkers for cancer cell imaging. *Chem Commun (Camb)* 49:8030–2.
  52. Devenish SR, Hill JB, Blunt JW, Morris JC, Munro MH (2006) Dual side-reactions limit the utility of a key polymer therapeutic precursor. *Tetrahedron letters* 47:2875–2878.
  53. Blazejewski J-C, Hofstraat JW, Lequesne C, Wakselman C, Wiersum UE (1999) Halogenoaryl acrylates: preparation, polymerization and optical properties. *Journal of fluorine chemistry* 97:191–199.
  54. Eberhardt M, Mruk R, Zentel R, Theato P (2005) Synthesis of pentafluorophenyl (meth) acrylate polymers: New precursor polymers for the synthesis of multifunctional materials. *European Polymer Journal* 41:1569–1575.
  55. Hemmelmann M, Kurzbach D, Koynov K, Hinderberger D, Zentel R (2012) Aggregation Behavior of Amphiphilic p (HPMA)-co-p (LMA) Copolymers Studied by FCS and EPR Spectroscopy. *Biomacromolecules* 13:4065–4074.
  56. Günay KA, Schüwer N, Klok H-A (2012) Synthesis and post-polymerization modification of poly (pentafluorophenyl methacrylate) brushes. *Polymer Chemistry* 3:2186–2192.
  57. Beija M, Li Y, Lowe AB, Davis TP, Boyer C (2013) Factors influencing the synthesis and the post-modification of PEGylated pentafluorophenyl acrylate containing copolymers. *European Polymer Journal* 49:3060–3071.
  58. Jochum FD, Theato P (2009) Temperature and light sensitive copolymers containing azobenzene moieties prepared via a polymer analogous reaction. *Polymer* 50:3079–3085.
  59. Beatty KE (2011) Chemical strategies for tagging and imaging the proteome. *Mol BioSyst* 7:2360–2367.

- 
60. Wu AM, Senter PD (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature Biotechnology* 23:1137–1146.
  61. Alley SC, Okeley NM, Senter PD (2010) Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Current opinion in chemical biology* 14:529–537.
  62. Hodgson DR, Sanderson JM (2004) The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids. *Chemical Society Reviews* 33:422–430.
  63. Narain R (2013) *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications* (John Wiley & Sons).
  64. Lin D, Saleh S, Liebler DC (2008) Reversibility of covalent electrophile- protein adducts and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology* 21:2361–2369.
  65. Gauthier MA, Klok H-A (2010) Polymer-protein conjugates: an enzymatic activity perspective. *Polymer Chemistry* 1:1352–1373.
  66. Klok H-A (2009) Peptide/protein- synthetic polymer conjugates: Quo vadis. *Macromolecules* 42:7990–8000.
  67. Lutz J-F, Börner HG (2008) Modern trends in polymer bioconjugates design. *Progress in Polymer Science* 33:1–39.
  68. Jung B, Theato P (2013) in *Bio-synthetic Polymer Conjugates* (Springer), pp 37–70.
  69. Gauthier MA, Klok H-A (2008) Peptide/protein-polymer conjugates: synthetic strategies and design concepts. *Chemical Communications*:2591–2611.
  70. Abuchowski A, Van Es T, Palczuk N, Davis F (1977) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *Journal of Biological Chemistry* 252:3578–3581.
  71. Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, van Es T, Davis FF (1977) Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry* 252:3582–3586.
  72. Sumerlin BS (2011) Proteins as initiators of controlled radical polymerization: grafting-from via ATRP and RAFT. *ACS Macro Letters* 1:141–145.
  73. Niemeyer CM (2001) Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie International Edition* 40:4128–4158.
  74. Ponader D, Wojcik F, Beceren-Braun F, Dervede J, Hartmann L (2012) Sequence-defined glycopolymer segments presenting mannose: synthesis and lectin binding affinity. *Biomacromolecules* 13:1845–1852.
  75. You L-C, Lu F-Z, Li Z-C, Zhang W, Li F-M (2003) Glucose-sensitive aggregates formed by poly (ethylene oxide)-block-poly (2-glucosyl-oxyethyl acrylate) with concanavalin A in dilute

---

aqueous medium. *Macromolecules* 36:1–4.

76. Chang H-P, Chen J-Y, Zhong P-S, Chang Y-H, Liang M (2012) Synthesis and characterization of a new polymer-drug conjugate with pH-induced activity. *Polymer* 53:3498–3507.
77. Tappertzhofen K et al. (2012) Synthesis of Maleimide-Functionalized HPMa-Copolymers and in vitro Characterization of the aRAGE-and Human Immunoglobulin (huIgG)-Polymer Conjugates. *Macromolecular Bioscience*.
78. Duncan R (2011) Polymer therapeutics as nanomedicines: New perspectives. *Current Opinion in Biotechnology* 22:492–501.
79. Duncan R (2003) The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2:347–360.
80. Pelegri-O'Day EM, Lin E-W, Maynard HD (2014) Therapeutic Protein-Polymer Conjugates: Advancing Beyond PEGylation. *Journal of the American Chemical Society* 136:14323–14332.
81. Lavigueur C et al. (2011) Thermoresponsive giant biohybrid amphiphiles. *Polymer Chemistry* 2:333–340.
82. Boerakker MJ et al. (2002) Giant amphiphiles by cofactor reconstitution. *Angewandte Chemie International Edition* 41:4239–4241.
83. Van Rijn P (2013) Polymer directed protein assemblies. *Polymers* 5:576–599.
84. Velonia K (2010) Protein-polymer amphiphilic chimeras: Recent advances and future challenges. *Polymer Chemistry* 1:944–952.
85. Kuan SL, Wu Y, Weil T (2013) Precision Biopolymers from Protein Precursors for Biomedical Applications. *Macromolecular Rapid Communications* 34:380–392.
86. Zhao L et al. (2014) Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32:327–337.
87. Zhang W et al. (2014) Immune responses to vaccines involving a combined antigen-nanoparticle mixture and nanoparticle-encapsulated antigen formulation. *Biomaterials* 35:6086–6097.
88. Akagi T, Wang X, Uto T, Baba M, Akashi M (2007) Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly (amino acid) derivatives. *Biomaterials* 28:3427–3436.
89. Kanchan V, Katare YK, Panda AK (2009) Memory antibody response from antigen loaded polymer particles and the effect of antigen release kinetics. *Biomaterials* 30:4763–4776.
90. Filpula D (2007) Antibody engineering and modification technologies. *Biomolecular Engineering* 24:201–215.

- 
91. Danial M, Root MJ, Klok H-A (2012) Polyvalent side chain peptide-synthetic polymer conjugates as HIV-1 entry inhibitors. *Biomacromolecules* 13:1438–1447.
  92. Shimoboji T, Larenas E, Fowler T, Hoffman AS, Stayton PS (2003) Temperature-induced switching of enzyme activity with smart polymer-enzyme conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 14:517–525.
  93. Shakya AK, Sharma P, Kumar A (2010) Synthesis and characterization of thermo-responsive poly (N-isopropylacrylamide)-bovine liver catalase bioconjugate. *Enzyme and Microbial Technology* 47:277–282.
  94. Ding Z, Chen G, Hoffman AS (1998) Unusual properties of thermally sensitive oligomer-enzyme conjugates of poly (N-isopropylacrylamide)-trypsin. *Journal of Biomedical Materials Research* 39:498–505.
  95. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics* 10:32–42.
  96. Miller TA, Witter DJ, Belvedere S (2003) Histone deacetylase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 46:5097–5116.
  97. Ropero S, Esteller M (2007) The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology* 1:19–25.
  98. Bertrand P (2010) Inside HDAC with HDAC inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45:2095–2116.
  99. Hildmann C et al. (2004) A new amidohydrolase from *Bordetella* or *Alcaligenes* strain FB188 with similarities to histone deacetylases. *Journal of Bacteriology* 186:2328–2339.
  100. Hildmann C (2005) Funktionelle Charakterisierung bakterieller Histondeacetylase-ähnlicher Amidohydrolasen (HDAH).
  101. Feher G, Allen JP, Okamura M, Rees D (1989) Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres. *Nature* 339:111–116.
  102. Wald G (1968) The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219:800–807.
  103. Serwa R et al. (2010) Site-specific PEGylation of proteins by a Staudinger-phosphite reaction. *Chemical Science* 1:596–602.
  104. Szymanski W, Beierle JM, Kistemaker HA, Velema WA, Feringa BL (2013) Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chemical Reviews* 113:6114–6178.
  105. Haque MM, Sun H, Liu S, Wang Y, Peng X (2014) Photoswitchable Formation of a DNA Interstrand Cross-Link by a Coumarin-Modified Nucleotide. *Angewandte Chemie International Edition* 53:7001–7005.

- 
106. Cahová H, Jäschke A (2013) Nucleoside-Based Diarylethene Photoswitches and Their Facile Incorporation into Photoswitchable DNA. *Angewandte Chemie International Edition* 52:3186–3190.
  107. Patnaik S, Kumar P, Garg B, Gandhi R, Gupta K (2007) Photomodulation of PS-modified oligonucleotides containing azobenzene substituent at pre-selected positions in phosphate backbone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15:7840–7849.
  108. Yamana K, Yoshikawa A, Nakano H (1996) Synthesis of a new photoisomerizable linker for connecting two oligonucleotide segments. *Tetrahedron Letters* 37:637–640.
  109. Jäschke A (2012) Genetically encoded RNA photoswitches as tools for the control of gene expression. *FEBS Letters* 586:2106–2111.
  110. Rudiuk S et al. (2011) Light-regulated mRNA condensation by a photosensitive surfactant works as a series photoswitch of translation activity in the presence of small RNAs. *Biomacromolecules* 12:3945–3951.
  111. Zhang F, Sadovski O, Woolley GA (2008) Synthesis and Characterization of a Long, Rigid Photoswitchable Cross-Linker for Promoting Peptide and Protein Conformational Change. *ChemBioChem* 9:2147–2154.
  112. Renner C, Moroder L (2006) Azobenzene as conformational switch in model peptides. *ChemBioChem* 7:868–878.
  113. Goodman M, Falxa ML (1967) Conformational aspects of polypeptide structure. XXIII. Photoisomerization of azoaromatic polypeptides. *Journal of the American Chemical Society* 89:3863–3867.
  114. Korbus M, Balasubramanian G, Müller-Plathe F, Kolmar H, Meyer-Almes F-J (2014) Azobenzene switch with a long-lived cis-state to photocontrol the enzyme activity of a histone deacetylase-like amidohydrolase. *Biological Chemistry*:401–12.
  115. Horstmann B et al. (2014) Synthesis of azobenzenealkylmaleimide probes to photocontrol the enzyme activity of a bacterial histone deacetylase-like amidohydrolase. *Bioorganic Chemistry* 57:155–161.
  116. Mourot A et al. (2012) Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nature Methods* 9:396–402.
  117. Banghart MR et al. (2009) Photochromic Blockers of Voltage-Gated Potassium Channels. *Angewandte Chemie International Edition* 48:9097–9101.
  118. Fortin DL et al. (2008) Photochemical control of endogenous ion channels and cellular excitability. *Nature Methods* 5:331–338.
  119. Samanta S, Woolley GA (2011) Bis-Azobenzene Crosslinkers for Photocontrol of Peptide Structure. *ChemBioChem* 12:1712–1723.

- 
120. Kumita JR, Smart OS, Woolley GA (2000) Photo-control of helix content in a short peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:3803–3808.
  121. Flint DG, Kumita JR, Smart OS, Woolley GA (2002) Using an azobenzene cross-linker to either increase or decrease peptide helix content upon trans-to-cis photoisomerization. *Chemistry & Biology* 9:391–397.
  122. Kusebauch U et al. (2006) Photocontrolled folding and unfolding of a collagen triple helix. *Angewandte Chemie International Edition* 45:7015–7018.
  123. Schierling B et al. (2010) Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:1361–1366.
  124. Willner I, Rubin S, Riklin A (1991) Photoregulation of papain activity through anchoring photochromic azo groups to the enzyme backbone. *Journal of the American Chemical Society* 113:3321–3325.
  125. Inada T, Terabayashi T, Yamaguchi Y, Kato K, Kikuchi K (2005) Modulation of the catalytic mechanism of hen egg white lysozyme (HEWL) by photochromism of azobenzene. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 175:100–107.
  126. Erlanger BF, Wassermann NH, Cooper AG, Monk RJ (1976) Allosteric activation of the hydrolysis of specific substrates by chymotrypsin. *European Journal of Biochemistry* 61:287–295.
  127. Yamada MD, Nakajima Y, Maeda H, Maruta S (2007) Photocontrol of kinesin ATPase activity using an azobenzene derivative. *Journal of Biochemistry* 142:691–698.
  128. Lemoine D et al. (2013) Optical control of an ion channel gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:20813–20818.
  129. Shishido H, Yamada MD, Kondo K, Maruta S (2009) Photocontrol of calmodulin interaction with target peptides using azobenzene derivative. *Journal of Biochemistry* 146:581–590.
  130. Harvey JH, Trauner D (2008) Regulating enzymatic activity with a photoswitchable affinity label. *ChemBioChem* 9:191–193.
  131. Numano R et al. (2009) Nanosculpting reversed wavelength sensitivity into a photoswitchable iGluR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:6814–6819.
  132. Karube I, Nakamoto Y, Namba K, Suzuki S (1976) Photocontrol of urease-collagen membrane activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 429:975–981.
  133. Park JH et al. (2015) Cofactor-Free Light-Driven Whole-Cell Cytochrome P450 Catalysis. *Angewandte Chemie* 127:983–987.
  134. Yadav RK et al. (2012) A photocatalyst-enzyme coupled artificial photosynthesis system for solar energy in production of formic acid from CO<sub>2</sub>. *Journal of the American Chemical Society* 134:11455–11461.



- 
135. Yadav RK et al. (2014) Highly Selective Solar-Driven Methanol from CO<sub>2</sub> by a Photocatalyst/Biocatalyst Integrated System. *Journal of the American Chemical Society* 136:16728–16731.
136. Kato M et al. (2014) Regio- and stereoselective hydroxylation of 10-undecenoic acid with a light-driven P450 BM3 biocatalyst yielding a valuable synthon for natural product synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22:5687–5691.
137. Stephanopoulos N, Francis MB (2011) Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nature Chemical Biology* 7:876–884.
138. Gorostiza P et al. (2007) Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:10865–10870.
139. Su C-Y, London E, Sampson NS (2013) Mapping peptide thiol accessibility in membranes using a quaternary ammonium isotope-coded mass tag (ICMT). *Bioconjugate Chemistry* 24:1235–1247.
140. Song K-S et al. (2009) Synthesis and structure-activity relationship of novel diarylpyrazole imide analogues as CB1 cannabinoid receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17:3080–3092.
141. Boutin RH, Loudon GM (1984) Conversion of aliphatic amides into amines with [I, I-bis (trifluoroacetoxy) iodo] benzene. 2. Kinetics and mechanism. *The Journal of Organic Chemistry* 49:4277–4284.
142. Bernatowicz MS, Daniels SB, Köster H (1989) A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides. *Tetrahedron Letters* 30:4645–4648.
143. Freitas JM, Abrantes LM, Darbre T (2005) Synthesis of Long-Chain 3-Alkylpyrroles Bearing Terminal Carboxy or Amino Groups. *Helvetica Chimica Acta* 88:2470–2478.
144. Fulmer GR et al. (2010) NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 29:2176–2179.
145. Poplewska I, Muca R, Strachota A, Piłkatoski W, Antos D (2014) Adsorption behavior of proteins on temperature-responsive resins. *Journal of Chromatography A* 1324:181–189.
146. Liu Z et al. (2012) Separation of peptides with an aqueous mobile phase by temperature-responsive chromatographic column. *Journal of Separation Science* 35:2069–2074.
147. Yoshizako K et al. (2002) Regulation of protein binding toward a ligand on chromatographic matrixes by masking and forced-releasing effects using thermoresponsive polymer. *Analytical Chemistry* 74:4160–4166.
148. Yamanaka H et al. (2003) Affinity chromatography with collapsibly tethered ligands. *Analytical Chemistry* 75:1658–1663.

- 
149. Bantscheff M, Scholten A, Heck AJ (2009) Revealing promiscuous drug-target interactions by chemical proteomics. *Drug Discovery Today* 14:1021–1029.
  150. Merino E, Ribagorda M (2012) Control over molecular motion using the cis-trans photoisomerization of the azo group. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8:1071–1090.
  151. Lomant AJ, Fairbanks G (1976) Chemical Probes of Extended Biological Structures: Synthesis and Properties of the Cleavable Protein Cross-linking Reagent [35S] Dithiobis (succinimidyl propionate). *Journal of Molecular Biology* 104:243–261.
  152. Sipaut CS et al. (2014) An optimized preparation of bismaleimide-diamine co-polymer matrices. *Polymers for Advanced Technologies* 25:673–683.
  153. Sahu US, Bhadani SN (1982) Homopolymerization of maleimide. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* 3:103–107.
  154. Hopewell J, George G, Hill D (2000) Quantitative analysis of bismaleimide-diamine thermosets using near infrared spectroscopy. *Polymer* 41:8221–8229.



---

Enger, den 28. August 2015


Benjamin Horstmann  
Meller Str. 70  
32130 Enger

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

(Benjamin Horstmann)



---

Enger, den 28. August 2015

Benjamin Horstmann  
Meller Str. 70  
32130 Enger

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

\_\_\_\_\_  
(Benjamin Horstmann)

---

## LEBENS LAUF

---

### ▪ PERSÖNLICHE DATEN

Name: Benjamin Horstmann  
Geburtsdatum: 21.07.1981  
Geburtsort: Bünde (Westf.)

### ▪ WERDEGANG

03.2011 – jetzt	<b>Technische Universität Darmstadt</b> (AG Prof. Dr. M. Biesalski, Makromolekulare Chemie) <b>Hochschule Darmstadt</b> (AG Prof. Dr. F.-J. Meyer-Almes, Chemie- und Biotechnologie) <i>Kooperative Promotion</i> <i>Thema: Stimulussensitive Polymersysteme zur Biokonjugation an Proteinen am Beispiel der Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase</i>
03.2010 – 12.2010	<b>Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung Abt. Biomolekulare Systeme</b> <i>Forschungspraktikum anschließend Masterarbeit</i> <i>Thema: Synthesis of Mannose bearing Building Blocks for the Poly(amidoamine) Solid Phase Synthesis</i> (AG Prof. Dr. L. Hartmann)
08.2009 – 10.2009	<b>Bundesanstalt für Materialprüfung und -forschung</b> <i>Forschungspraktikum</i> <i>Thema: Modifizierung von Polypropylenoberflächen zur Verbesserung der Haftfestigkeit</i> (Abt. VI.5 Prof. Dr. J. F. Friedrich)
01.2009 – 12.2009	<b>Freie Universität Berlin</b> <i>Studentische Hilfskraft</i> (AG Dr. C. P. R Hackenberger)
10.2008 – 12.2010	<b>Freie Universität Berlin</b> <i>Master of Science (Chemie)</i> (Note: 1.6)
10.2005 – 09.2008	<b>Freie Universität Berlin</b> <i>Bachelor of Science (Chemie)</i> (Note: 2.3) <i>Thema der Bachelorarbeit: Synthese von wasserlöslichen Phosphiten für die Staudinger Ligation</i> (AG Prof. Dr. C. P. R. Hackenberger)
08.2002 – 09.2005	<b>Bio-Circle Surface Technology GmbH, Gütersloh</b> <i>Ausbildung zum Chemikanten</i> (bis 05.2005)
08.2001 – 05.2005	<b>Allgemeines Krankenhaus Eilbeck, Hamburg</b> <i>Zivildienst</i>
08.1992 – 06.2001	<b>Regenbogen-Gesamtschule Spenge</b> <i>Abitur</i>

Enger, den 28. August 2015

Benjamin Horstmann